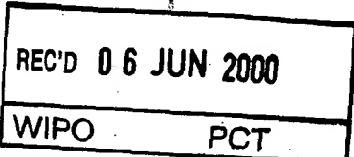


18. Mai 2000



Bescheinigung

EP 00/2410

Die BIOSYN ARZNEIMITTEL GMBH in Fellbach/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für ein Hämocyanin kodierende Nukleinsäuresequenz"

am 17. März 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol C 07 H 21/04 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 11. Mai 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Weihmayer

Aktenzeichen: 199 11 971.6

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für ein Hämocyanin kodierende Nukleinsäuresequenz

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für ein Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne oder ein Fragment mit den immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin kodierende Nukleinsäuresequenz, diese umfassende Konstrukte, die Nukleinsäuresequenzen oder die Konstrukte umfassende Wirtszellen, Verfahren zum Herstellen von Hämocyanin-Polypeptiden und rekombinante Hämocyanin-Polypeptide.

Hämocyanin ist ein blaues Kupferprotein, das frei gelöst im Blut zahlreicher Mollusken und Arthropoden auftritt und den Sauerstoff transportiert. Von den Mollusken enthalten die Cephalopoden, Chitonen, die meisten Gastropoden sowie einige Bivalvia Hämocyanin. Hämocyanin ist bei den Arthropoden typisch für Arachniden, Xiphosuren, malakostrake Crustaceen und *Scutigera*. Zahlreiche Insektenarten weisen Proteine auf, die sich von Hämocyanin ableiten. Hämocyanine liegen extrazellulär vor und flottieren in der Hämolymphe.

Während das Arthropoden-Hämocyanin bei elektronenmikroskopischer Untersuchung einen Durchmesser von maximal 25 nm hat und eine Untereinheit ein Molekulargewicht von 75.000 Da aufweist, sind Molluskencyanine viel größer. So hat z.B. das Hämocyanin von *Megathura* einen Durchmesser von 35 nm und ist aus 2 Untereinheiten zusammengesetzt. Jede Untereinheit hat ein Molekulargewicht von ca. 400.000 Da und ist in acht sauerstoffbindende Domänen aufgeteilt, die jeweils ein Molekulargewicht von ca. 50.000 Da haben. Die Domänen unterscheiden sich immunologisch. Diese Domänen können durch limitierte Proteolyse aus der Untereinheit freigesetzt werden.

Das im Elektronenmikroskop sichtbare Hämocyanin der Gastropoden hat ein Molekulargewicht von ca. 8 Mio. Da und ist ein Di-Dekamer. Im Gegensatz hierzu ist das Hämocyanin der Cephalopoden als isoliertes Dekamer angeordnet, das sich auch in der Quartärstruktur deutlich vom Hämocyanin der Gastropoden unterscheidet.

Von besonderem immunologischen Interesse ist das Hämocyanin der kalifornischen Schlüssellochschnecke *Megathura crenulata*, einer „Keyhole Limpet“. Das Hämocyanin wird deshalb auch als Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) bezeichnet. Hämocyanine sind sehr starke Antigene. Die Immunisierung eines Vertebraten führt zu einer bisher wenig verstandenen, unspezifischen Aktivierung des Immunsystems. Durch die allgemeine Aktivierung des Immunsystems ist es dann möglich, auch eine Immunreaktion gegenüber anderen, bisher tolerierten Fremdstrukturen zu erreichen. KLH wird vor allem als Hapten-Träger verwendet, um so die Bildung von Antikörpern gegen das Hapten zu erreichen.

Neben *Megathura crenulata* gehört auch das Seeohr *Haliotis tuberculata* zur im Hinblick auf die Evolution relativ alten Gruppe der Archaeogastropoda. Es ist bekannt, daß auch *Haliotis* Hämocyanin produziert.

KLH ist ein Gemisch aus zwei unterschiedlichen Hämocyaninen, die als KLH1 und KLH2 bezeichnet werden. Die Untereinheit des KLH1 ist ein 390 kDa Polypeptid, das aus acht globulären Domänen besteht, die entsprechend ihrer Reihenfolge in der Untereinheit mit 1 a bis 1 h bezeichnet werden. KLH2 hingegen weist ein Molekulargewicht von 350 kDa auf und enthält nach neuesten Daten ebenfalls 8 Domänen, die als 2 a bis 2 h bezeichnet werden. *In vivo* bildet jede Art von Untereinheit Homo-Oligomere, wohingegen Hetero-Oligomere nicht beobachtet wurden.

Durch limitierte Proteolyse und gekreuzte Immunelektrophorese der Untereinheit von KLH1 und KLH2 wurden amino-, interne und carboxy-terminale Domänen erhalten, deren amino-terminale Sequenz bestimmt wurde (Söhngen et al., Eur. J. Biochem. 248 (1997), 602-614; Gebauer et al., Zoology 98(1994), 51-68). Die erhaltenen Sequenzen erlauben jedoch nicht den Entwurf sequenzspezifischer Primer und/oder Sonden, die für eine Hybridisierung mit genomischer DNA Erfolg versprechen. Obwohl beide KLH-Typen seit 1991 bzw. 1994 bekannt sind, konnte daher bisher keine Primärstruktur aufgeklärt werden.

Auf DNA-Ebene ist bisher in bezug auf Mollusken nur die cDNA-Sequenz der Hämocyanin-Untereinheit aus dem Cephalopoden *Octopus dofleini* bekannt (Miller et al., J. Mol. Biol. 278 (1998), 827-842). *Octopus dofleini* ist phylogenetisch von den Archae-gastropoden sehr weit entfernt. Eine Hämocyanin-Gensequenz aus Mollusken ist bisher überhaupt nicht bekannt.

Wie von Miller et al. supra beschrieben, ist es sowohl schwierig, eine einzige funktionelle Domäne (Funktionelle Einheit = Domäne; auch „funktionelle Domäne“ genannt) zu isolieren als auch Gewebe zu erhalten, das zur Aufreinigung von mRNA für die cDNA-Sequenzierung geeignet ist.

Bei der Analyse des Hämocyanins aus *Megathura crenulata* besteht eine weitere Schwierigkeit darin, daß die Versuchstiere ein Alter von 4 bis 8 Jahren erreicht haben müssen, um ihnen erstmals Hämolymphe entnehmen zu können. Nach Entnahme der Hämolymphe wird Hämocyanin bei diesen Tieren nicht nachproduziert. Bisher ist nicht bekannt, wie die Hämocyaninsynthese stimuliert werden könnte. Darüber hinaus ist die Zucht von *Megathura* äußerst aufwendig, da hierfür spezielle Strömungsbecken erforderlich sind.

Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Mittel und Wege bereitzustellen, um Hämocyanin und/oder Domänen davon in ausreichender Menge und kostengünstig produzieren zu können. Dies umfaßt die weitere Aufgabe, ein Verfahren anzugeben, mit dem dieses Hämocyanin hergestellt werden kann.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Nukleinsäure-Molekül, umfassend eine für ein Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne oder ein funktionelles Fragment davon mit den immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins kodierende Nukleinsäuresequenz, wobei die Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus

- (a) der Gruppe der nachfolgend angegebenen DNA-Sequenzen bzw. der ihnen entsprechenden RNA-Sequenzen:

in SEQ ID NO:1 (HtH1 Domäne b),

SEQ ID NO:2 (HtH1 Domäne c),

SEQ ID NO:3 (HtH1 Domäne d),

SEQ ID NO:4 (HtH1 Domäne e),

SEQ ID NO:5 (HtH1 Domäne f),

SEQ ID NO:6 (HtH1 Domäne g),

SEQ ID NO:7 (HtH1 Domäne h),

SEQ ID NO:8 (partielle HtH2 Domäne b),

SEQ ID NO:9 (HtH2 Domäne c),

SEQ ID NO:10 (HtH2 Domäne d),

SEQ ID NO:11 (HtH2 Domäne e),

SEQ ID NO:12 (HtH2 Domäne f),

SEQ ID NO:13 (HtH2 Domäne g),

SEQ ID NO:14 (HtH2 Domäne h),

SEQ ID NO:15 (partielle KLH1 Domäne c),

SEQ ID NO:16 (KLH1 Domäne d),

SEQ ID NO:17 (partielle KLH1 Domäne e),

SEQ ID NO:18 (KLH2 Domäne b),

SEQ ID NO:19 (KLH2 Domäne c),

(b) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem Gegenstrang einer Nukleinsäuresequenz nach (a) hybridisieren und für ein Polypeptid kodieren, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist;

(c) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des genetischen Codes zu den unter (a) und (b) definierten DNA-Sequenzen degeneriert sind und für ein Polypeptid kodieren, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist;

(d) Nukleinsäuresequenzen, die mit einer der unter (a) bis (c) angegebenen Nukleinsäuresequenzen hybridisieren und deren Gegenstrang für ein Polypeptid kodiert,

das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist;

- (e) Nukleinsäuresequenzen, die wenigstens 60 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen sind;
- (f) ~~Varianten der unter (a) bis (e) angegebenen Sequenzen, wobei die Varianten Additionen, Deletionen, Insertionen oder Inversionen aufweisen und für ein Polypeptid kodieren, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin aufweist; und~~
- (g) Kombinationen mehrerer der unter (a) bis (f) angegebenen DNA-Sequenzen.

Im nachfolgenden werden einige Begriffe näher erläutert, um klarzustellen, wie sie im Zusammenhang der vorliegenden Anmeldung verstanden werden sollen.

Der Begriff "Hämocyanin", so, wie er nachfolgend in der Beschreibung verwendet wird, umfaßt vollständiges Hämocyanin, Hämocyanin-Domänen und/oder Fragmente, Hämocyanin-Mutanten und Fusionsproteine. In bezug auf die Fusionsproteine sind insbesondere solche umfaßt, bei denen die Fusion Hämocyanin und Antigene umfaßt.

Unter „Domänen“ werden funktionelle Teilsequenzen der Hämocyanin-Untereinheiten verstanden, die beispielsweise durch limitierte Proteolyse voneinander abgetrennt werden können. Weiterhin können sie unterschiedliche immunologische Eigenschaften aufweisen.

Mit den „immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin“ ist die Eigenschaft eines Polypeptids gemeint, in gleicher Weise wie wenigstens eine Domäne von Hämocyanin eine immunologische Antwort des Empfängers zu induzieren, der mit dem Polypeptid immunisiert wird. Unter „immunologischer Antwort“ werden hier T- und/oder B-Zell-Antworten gegen Hämocyanin-Epitope verstanden, wie beispielsweise eine Antikörperproduktion. Die immunologische Reaktion kann beispielsweise beob-

achtet werden durch Immunisieren eines Säugers, wie z.B. einer Maus, einer Ratte oder eines Kaninchens mit dem entsprechenden Polypeptid und Vergleich der Immunantwort auf das zur Immunisierung verwendete Polypeptid mit der Immunantwort auf natürliche Hämocyanine.

Der Begriff "Antigen" umfaßt erfindungsgemäß sowohl Haptene, als auch schwache und starke Antigene. Haptene sind dadurch charakterisiert, daß sie Substanzen niedriger Molekulmasse (kleiner als 4000 Da) sind, jedoch ohne Kopplung an ein Trägermolekül nicht in der Lage sind, eine immunologische Reaktion auszulösen. Schwache Antigene sind Substanzen, die selbst bereits eine immunologische Reaktion auslösen können, deren Potential, eine immunologische Reaktion auslösen zu können, durch Kopplung mit einem Träger-Molekül auf Protein- und/oder DNA-Ebene, noch erhöht werden kann.

"His-Tag" bedeutet eine Sequenz von wenigstens 6 Histidin-Aminosäuren, die durch entsprechende Klonierung und Fusion mit einer exprimierbaren Sequenz zu einem Fusionsprotein mit wenigstens 6 His-Resten am NH₂-Terminus führt, das leicht durch Komplexierung mit einer Ni²⁺-Säule aufgereinigt werden kann.

"Klonierung" soll alle im Stand der Technik bekannten Klonierungsmethoden umfassen, die hier zum Einsatz kommen könnten, die jedoch nicht alle im einzelnen beschrieben werden, weil sie zum selbstverständlichen Handwerkszeug des Fachmanns gehören.

Unter "rekombinanter Expression in einer geeigneten Wirtszelle" sollen alle im Stand der Technik bekannten Expressionsmethoden in bekannten Expressionssystemen verstanden werden, die hier zum Einsatz kommen könnten, jedoch nicht alle im einzelnen beschrieben werden, weil sie zum selbstverständlichen Handwerkszeug des Fachmanns gehören.

Die im erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül enthaltene Nukleinsäuresequenz kann genomische DNA, cDNA oder synthetische DNA sein, wobei unter synthetischen DNA-Sequenzen auch solche verstanden werden, die modifizierte Internukleosid-Bindungen enthalten. Weiter kann es sich bei den Nukleinsäuresequenzen um RNA-Sequenzen

handeln, was z.B. für die Expression mittels rekombinanter Vektorsysteme erforderlich sein kann. Die Nukleinsäuresequenzen gemäß (b) sind beispielsweise erhältlich durch Verwenden einer nachweisbar markierten Sonde, die einer der unter (a) angegebenen Sequenzen oder einem Fragment bzw. deren Gegenstrang entspricht, zum Screening von cDNA-/genomischen DNA-Bibliotheken aus Mollusken oder Arthropoden. Die der cDNA-Bibliothek zugrundeliegende mRNA ist vorzugsweise aus Mollusken-Geweben zu erhalten, die Hämocyanin besonders stark exprimieren, wie z.B. Mantel-Gewebe aus Gastropoden und Branchialdrüsengewebe aus Cephalopoden.

Die Identifizierung positiver cDNA-/genomischer DNA-Klone erfolgt gemäß Standardverfahren. Vgl. Maniatis et al., Molecular Cloning (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die unter (b) oder (d) angegebene Hybridisierung unter stringenten Bedingungen durchgeführt. Stringente Hybridisierungsbedingungen sind z.B. 68°C über Nacht in 0,5 x SSC; 1% Blockierungsreagenz (Boehringer Mannheim); 0,1 % Natriumlaurylsarcosinat und nachfolgendem Waschen mit 2 x SSC; 0,1 % SDS.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Nukleinsäuresequenzen bereitgestellt, die wenigstens 60 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen sind. Bevorzugt sind die Nukleinsäuresequenzen wenigstens 80 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen. Besonders bevorzugt sind die Nukleinsäuresequenzen wenigstens 90 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen. Insbesondere sind die Nukleinsäuresequenzen wenigstens 95 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen.

Erfindungsgemäß bedeutet der Ausdruck „Homologie“ Homologie auf DNA-Ebene, die gemäß bekannter Verfahren, z.B. der computergestützten Sequenzvergleiche (Basic local alignment search tool, S.F. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410) bestimmt werden kann.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße DNA-Sequenz eine Kombination mehrerer der unter (a) bis (f) angegebenen DNA-Sequenzen, die durch dem Fachmann bekannte Fusion und gegebenenfalls Klonierung erhalten werden können. Diese Kombination sind von besonderem Interesse, da sie besonders immunogen sind. Insbesondere sind Kombinationen bevorzugt, die mehrere oder alle Domänen in der in der Untereinheit natürlicherweise vorkommenden Reihenfolge (a bis h) aufweisen. ~~Besonders bevorzugt sind dabei Ausführungsformen, in denen die für die Domänen kodierenden Nukleinsäuresequenzen direkt im Raster aneinandergekoppelt sind.~~

Weiterhin werden Konstrukte bereitgestellt, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle umfassen. In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Konstrukt einen zur Expression geeigneten Promotor, wobei die Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle des Promoters steht. Die Wahl des Promoters hängt vom zur Expression verwendeten Expressionssystem ab. Generell sind konstitutive Promotoren bevorzugt, jedoch sind auch induzierbare Promotoren wie z.B. der Metallothionein-Promotor möglich.

In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Konstrukt ferner eine Antigen-kodierende Nukleinsäuresequenz, die direkt mit der erfindungsgemäßen Hämocyanin-Nukleinsäure verbunden ist. Die Antigen-kodierende Sequenz kann sowohl 5' als auch 3' relativ zur Hämocyanin-Sequenz oder auch an beiden Enden gelegen sein. Sie schließt im gleichen Leseraster entweder unmittelbar an die Hämocyanin-Sequenz an oder ist durch einen Nukleinsäure-Linker unter Wahrung des Leserasters mit ihr verbunden. Durch die Fusion der Antigen-kodierenden Sequenz mit der Hämocyanin-Sequenz ist die Bildung eines Fusionsproteins beabsichtigt, in dem die Antigen-kodierende Sequenz kovalent mit der Hämocyanin-Sequenz verbunden ist. Das erfindungsgemäße Antigen ist hierbei ein medizinisch relevantes Antigen, das beispielsweise ausgewählt ist aus: Tumorantigenen, Virusantigenen und Antigenen bakterieller oder parasitärer Pathogene. Tumorantigene können hierbei beispielsweise Rb und p53 sein. Vorzugsweise stammen die Virusantigene aus immunologisch relevanten Viren, wie z.B. Influenza-Virus, Hepatitis-Virus und HIV. Pathogenantigene sind unter anderem solche aus Säugerpathogenen, insbesondere humanpathogenen Organismen, wie z.B.

Plasmodium. Bakterielle Antigene können z.B. von *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Chlamydia*, *Streptococci* oder *Staphylococci* stammen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Konstrukt ferner wenigstens ein Teil eines Vektors, insbesondere regulatorische Regionen, wobei der Vektor ausgewählt ist aus : Bacteriophagen wie λ -Derivaten, Adenoviren, Vaccinia-viren, Baculoviren, SV40-Viren und Retroviren, vorzugsweise MoMuLV (Moloney Murine Leukemia Virus).

Ferner ist ein Konstrukt bevorzugt, das zusätzlich eine His-Tag-kodierende DNA-Sequenz umfaßt, die bei Expression des Konstrukts zur Bildung eines Fusionsproteins mit einem His-Tag am NH₂-Terminus des Hämocyanins führt, welches die Aufreinigung des Proteins an einer Nickel-Säule durch Chelat-Bildung erleichtert.

Ferner stellt die Erfindung Wirtszellen bereit, die das Konstrukt enthalten und die zur Expression des Konstruktes geeignet sind. Im Stand der Technik sind zahlreiche prokaryontische und eukaryontische Expressionssysteme bekannt, wobei die Wirtszellen beispielsweise ausgewählt sind aus prokaryontischen Zellen wie *E. coli* oder *B. subtilis*, aus eukaryontischen Zellen wie Hefezellen, Insektenzellen und Säugerzellen, z.B. CHO-Zellen, COS-Zellen oder HeLa-Zellen, sowie Derivaten davon. Im Stand der Technik sind beispielsweise bestimmte CHO-Produktionslinien bekannt, deren Glykosylierungsmuster im Vergleich zu CHO-Zellen verändert sind. Die durch die Verwendung Glykosylierungs-defizienter oder Glykosylierungs-verringerter Wirtszellen erhaltenen Hämocyanine verfügen möglicherweise über zusätzliche Epitope, die bei vollständiger Glykosylierung ansonsten dem Immunsystem des Empfängers nicht zugänglich sind, so daß Hämocyanine mit verringelter Glykosylierung unter Umständen eine erhöhte Immunogenität aufweisen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist weiter ein Verfahren zum Herstellen eines Hämocyanin-Polypeptids. Dazu wird das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül und/oder das Konstrukt in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert und das Protein aus der Wirtszelle oder dem Medium mittels üblicher Verfahren isoliert.

Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren zur Expression von DNA-Sequenzen bekannt; vergleiche Recombinant Gene Expression Protocols in Methods in Molecular Biology, Band 62, Humana Press Totowa New Jersey (1995). Die Expression kann sowohl konstitutiv als auch induzierbar sein, wobei Induktoren wie beispielsweise IPTG und Zn^{2+} dem Fachmann bekannt sind. Das hergestellte Hämocyanins kann, falls ein Histag an den NH_2 -Terminus des Hämocyanin fusioniert wurde, durch Chelat-Bildung an einer Nickel-Säule aufgereinigt werden. Verfahren zum Aufreinigen von Hämocyanin, insbesondere KLH, finden sich in Harris et al., Micron 26 (1995), 201-212. Vorzugsweise wird das Hämocyanin durch Ionenaustausch-Chromatographie und/oder Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt. Die Durchführung dieser Maßnahmen ist dem Fachmann bekannt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäß hergestellte Hämocyanin modifiziert. Die Modifikationen umfassen hierbei die Di-, Oligo- und Polymerisierung des monomeren Ausgangsprodukts beispielsweise durch Quervernetzung, z.B. durch Dicyclohexylcarbodiimid oder Pegylierung oder Assoziation (self assembly). Die somit hergestellten Di-, Oligo- und Polymere können voneinander durch Gelfiltration abgetrennt werden. Insbesondere beabsichtigt ist die Bildung von Dekameren, Didekameren oder Multi-Dekameren. Weitere Modifikationen umfassen Seitenketten-Modifikationen, beispielsweise von ϵ -Amino-Lysin-Resten des Hämocyanins, oder Ami- no- bzw. Carboxy-terminale Modifikationen. Besonders bevorzugt ist die Modifikation des Hämocyanins durch kovalente Bindung an ein Antigen, wobei das Antigen stöchiometrisch oder nicht-stöchiometrisch mit dem Hämocyanin umgesetzt sein kann. Das Antigen ist vorzugsweise ausgewählt aus Tumorantigenen, Virusantigenen und Pathogenantigenen wie oben ausgeführt. Weitere Modifikationen umfassen posttranskriptionale Ereignisse, z.B. die Glykosylierung oder die partielle oder vollständige Deglykosylierung des Proteins.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erhaltene Hämocyanin bei rekombinanter Expression in Prokaryonten oder Glykosylierungs-defizienten Eukaryonten nicht-glykosyliert. Ebenfalls in Betracht gezogen wird erfindungsgemäß Hämocyanin, das durch rekombinante Expression in zur Glykosylierung fähigen Eukaryonten wie Hefezel-

len, Insektenzellen oder Säugerzellen, wie CHO-Zellen oder HeLa-Zellen, glykosyliert ist.

In einer weiteren Ausführungsform werden Hämocyanin-Polypeptide zur Verfügung gestellt, die eine Aminosäuresequenz umfassen, wobei die Aminosäuresequenz von einer oder mehreren der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle kodiert wird.

Bevorzugt werden Hämocyanin-Polypeptide zur Verfügung gestellt, die wenigstens eine aus der folgenden Gruppe ausgewählte Aminosäuresequenz umfassen:

SEQ ID NO:20 (HtH1 Domäne b),
SEQ ID NO:21 (HtH1 Domäne c),
SEQ ID NO:22 (HtH1 Domäne d),
SEQ ID NO:23 (HtH1 Domäne e),
SEQ ID NO:24 (HtH1 Domäne f),
SEQ ID NO:25 (HtH1 Domäne g),
SEQ ID NO:26 (HtH1 Domäne h),
SEQ ID NO:27 (partielle HtH2 Domäne b),
SEQ ID NO:28 (HtH2 Domäne c),
SEQ ID NO:29 (HtH2 Domäne d),
SEQ ID NO:30 (HtH2 Domäne e),
SEQ ID NO:31 (HtH2 Domäne f),
SEQ ID NO:32 (HtH2 Domäne g),
SEQ ID NO:33 (HtH2 Domäne h),
SEQ ID NO:34 (partielle KLH1 Domäne c),
SEQ ID NO:35 (KLH1 Domäne d),
SEQ ID NO:36 (partielle KLH1 Domäne e),
SEQ ID NO:37 (KLH2 Domäne b),
SEQ ID NO:38 (KLH2 Domäne c),
oder ein Fragment einer dieser Sequenzen, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung Hämocyanin-Polypeptide, erhältlich durch das rekombinante Herstellungsverfahren oder Modifikationen davon, bereit.

Bevorzugt sind Hämocyanin-Polypeptide, die jede der Sequenzen SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 umfassen, und Hämocyanin-Polypeptide, die die Sequenzen SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 umfassen. Besonders bevorzugt handelt es sich bei diesen Hämocyanin-Polypeptiden um Hämocyanin 1 oder 2 aus *Haliotis tuberculata*.

Insbesondere bevorzugt ist Hämocyanin 1 aus *Haliotis tuberculata*, das ein scheinbares Molekulargewicht von 370 kDa in SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufweist. Weiterhin ist insbesondere Hämocyanin 2 aus *Haliotis tuberculata* bevorzugt, das ein scheinbares Molekulargewicht von 370 kDa in SDS-PAGE PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufweist. Die Hämocyanine sind durch das in den Beispielen beschriebene selektive Dissoziationsverfahren aus Gesamt-Hämocyanin aus *Haliotis tuberculata* erhältlich.

Weiterhin bevorzugt sind Hämocyanin-Polypeptide, die jede der Sequenzen SEQ ID NO: 34, 35 und 36 umfassen, und Hämocyanin-Polypeptide, die jede der Sequenzen SEQ ID NO: 37 und 38 umfassen.

Besonders bevorzugt handelt es sich bei diesen Hämocyanin-Polypeptiden um vollständiges Hämocyanin 1 (KLH1) oder 2 (KLH2) aus *Megathura crenulata*.

Weiterhin wird nicht-glykosyliertes und glykosyliertes Hämocyanin-Polypeptid, erhältlich durch Expression in zur Glykosylierung fähigen bzw. unfähigen Wirtszellen, bereitgestellt. Je nach vorgesehener Verwendung des Hämocyanin-Polypeptids kann das Glykosylierungsmuster von Hefe, insbesondere methylotropher Hefe, von COS- oder HeLa-Zellen bevorzugt sein.

Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Zusammensetzungen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle und physiologisch verträgliche Zusatzstoffe, die im Stand der Technik bekannt sind, enthalten. Vorzugsweise werden die pharmazeuti-

schen Zusammensetzungen zur unspezifischen Immunstimulierung in Form einer Gentherapie eingesetzt, wobei nach Transformation mit einem geeigneten Vektor Hämocyanin-Polypeptide exprimiert werden und zur Antigenisierung des Gewebes dienen.

Insbesondere sieht die vorliegende Erfindung die Verwendung eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls, das mit einer Antigen-kodierenden DNA-Sequenz verbunden ist, ~~zur spezifischen Immunisierung gegen dieses Antigen vor. Die Immunisierung~~ beruht hierbei, ohne an diese Theorie gebunden zu sein, auf der unspezifischen Stimulierung des Immunsystems durch Hämocyanin-Polypeptid-Epitope und die weitergehende spezifische Immunisierung durch Erkennung von Antigen-Epitopen durch das Immunsystem.

Eine solche Immunisierung ist besonders wertvoll im Hinblick auf Pathogen-Antigene, ganz besonders aber im Hinblick auf Tumorantigene. Die Anwendbarkeit der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen ergibt sich auch aus der Kreuzreakтивität der gebildeten Hämocyanin-spezifischen Antikörper mit Kohlenhydratresten, die auf der Oberfläche von Tumoren auftreten, wie z.B. dem Thomsen-Friedenreich-Antigen, das bei der Mehrzahl von humanen Tumoren wie Epithelialkarzinomen, Ovarialkarzinom, Kolonrektalkarzinom, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom und Harnblasenkarzinom auftritt.

Weiterhin können die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen zum Behandeln von parasitären Erkrankungen wie Schistosomiasis und für die Kokain-Mißbrauchsvorsorge eingesetzt werden.

Als weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verfügung gestellt, die ein erfindungsgemäßes Hämocyanin-Polypeptid in Verbindung mit einem oder mehreren physiologisch verträglichen Zusatzmitteln enthalten. Wie oben bereits erwähnt, kann ein solches Hämocyanin-Polypeptid aus einer vollständigen Hämocyanin-Untereinheit, aus einer oder mehreren Domänen sowie aus einem oder mehreren Fragmenten solcher Domänen bestehen, vorausgesetzt, daß diese Fragmente noch die immunologischen Eigenschaften wenigstens

22.03.06

einer Domäne eines Hämocyanins aufweist. Eine solche pharmazeutische Zusammensetzung eignet sich durch die entweder unspezifische Immunstimulation, die allein auf das Hämocyanin zurückzuführen ist, oder durch die spezifische Immunreaktion auf mit dem Hämocyanin assoziierte Antigene z.B. als Antiparasitenmittel, Antivirusmittel oder Antitumormittel. So kann sie z.B. zum Behandeln von Schistosomiasis, Epithelialkarzinomen, Ovarialkarzinom, Kolonrektalkarzinom, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom und Harnblasenkarzinomen eingesetzt werden, eignet sich jedoch auch zum Behandeln von Bluthochdruck. Die Behandlung von Bluthochdruck wird erreicht, indem eine Immunisierung mit Hilfe von erfindungsgemäßen Hämocyanin- β -adrenergen-Rezeptorpeptid-Konstrukten und/oder Fusionsproteinen durchgeführt wird.

In einer weiteren Ausführungsform werden die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen als Impfstoffe verwendet. Sie können somit einen wertvollen Beitrag zur Prophylaxe von durch bekannte Pathogene verursachte Erkrankungen leisten. Dies gilt insbesondere für pharmazeutische Zusammensetzungen, in denen ein Hämocyanin-Polypeptid an ein Virus, Virusbestandteil, abgetötete Bakterien, Bakterienbestandteile, insbesondere Oberflächenproteine aus Virus- oder Bakterienhüllen, DNA, DNA-Bestandteile, anorganische oder organische Moleküle, z.B. Kohlenhydrate, Peptide und/oder Glykoproteine gebunden ist.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung zur Kokain-Mißbrauchsvorsorge verwendet.

Zur Applikation sowohl der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle als auch der Hämocyanin-Polypeptide eignen sich insbesondere Liposomen. Dementsprechend umfaßt die vorliegende Erfindung Liposomen, die ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, ein erfindungsgemäßes Konstrukt oder ein erfindungsgemäßes Hämocyanin-Polypeptid umfassen.

Dem Fachmann sind verschiedene Verfahren zum Herstellen von Liposomen, die für pharmazeutische Zwecke verwendbar sind, bekannt. Die Selektivität der die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle oder Hämocyanin-Polypeptide enthaltenden Liposo-

men kann durch den zusätzlichen Einbau von Zellerkennungsmolekülen in die Liposomen erhöht werden, die selektiv an Zielzellen binden. Hierzu eignen sich insbesondere Rezeptorliganden, die an Rezeptoren der Zielzellen binden, oder, besonders im Fall von Tumoren, Antikörper, die gegen Oberflächenantigene der jeweils anvisierten Zielzellen gerichtet sind.

~~Die erfindungsgemäßen Hämocyanin-Polypeptide sind außerdem als Trägermolekül für Arzneistoffe, wie z. B. Cytostatika, vorgesehen. Die Vergrößerung des Molekulargewichtes verlängert die physiologische Halbwertszeit der Arzneistoffe erheblich, da der Verlust durch Ultrafiltration in der Niere deutlich verringert ist.~~

Die Zubereitung der Impfstoffe erfolgt nach dem Fachmann bekannten Verfahren; in einigen Ausführungsformen ist die zusätzliche Verwendung von Adjuvanzien wie z. B. Freundsches Adjuvant oder Polysacchariden vorgesehen.

Die Erfindung stellt ferner Antikörper bereit, die spezifisch mit dem erfindungsgemäßen Hämocyanin-Polypeptid reagieren und erhältlich sind durch Immunisieren eines Versuchstieres mit einem Hämocyanin-Polypeptid. Polyklonale Antikörper können durch Immunisieren beispielsweise von Kaninchen und anschließendem Gewinnen von Antiseren erhalten werden. Monoklonale Antikörper können gemäß Standardverfahren durch Immunisieren von z.B. Mäusen, Gewinnen und Immortalisieren der Milzzellen und Klonieren der Hybridome, die für Hämocyanin spezifische Antikörper produzieren, erhalten werden.

Weiterhin wird ein Screening-Verfahren zum Identifizieren von Tumor-spezifischer DNA in einer Zelle bereitgestellt, das die Schritte umfaßt:

- a) das Inkontaktbringen zellulärer DNA und/oder zellulären Proteins mit einer Sonde umfassend das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül und/oder den erfindungsgemäßen Antikörper und
- b) das Nachweisen der spezifischen Bindung.

Vorzugsweise ist der nachzuweisende Tumor ein Harnblasenkarzinom, Epithelialkarzinom, Ovarialkarzinom, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom oder Kolonrektalkarzinom.

Es ist beabsichtigt, mit den nachfolgenden Figuren und Beispielen die Erfindung zu erläutern, diese jedoch in keiner Weise einzuschränken. Dem Fachmann sind aufgrund der Beschreibung und der Beispiele weitere Ausführungsformen zugänglich, die ebenfalls umfaßt sind.

Fig. 1 zeigt die Charakterisierung und Aufreinigung von *Haliothis tuberculata*

Hämocyanin (HtH):

- (a) Elektronenmikroskopie von negativ gefärbtem Gesamt-HtH, das durch Ultrazentrifugation von Zell-freier Hämolymphe aufgereinigt wurde;
- (b) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (7,5 % Polyacrylamid) von HtH1 im Vergleich zu KLH (MW 370 kDa);
- (c) Native Polyacrylamid-Gelektrophorese (5 % Polyacrylamid) der HtH-Untereinheiten-Präparation, wobei die Anode am unteren Rand liegt;
- (d) Gekreuzte Immunelektrophorese der beiden HtH-Untereinheiten unter Verwendung von anti-HtH-Antikörpern aus Kaninchen;
- (e) Elektronenmikroskopie der verbleibenden HtH1-Didekamere (weiße Pfeile) nach der selektiven Dissoziation von HtH2 (schwarze Pfeile);
- (f) Elutionsprofil der Gelfiltrationschromatographie (Biogel A15m) in Gegenwart von Ammoniummolybdat/Polyethylenglykol-Lösung (pH 5,9) nach der selektiven Dissoziation von HtH2 in seine Untereinheit und nachfolgender Anreicherung von HtH1 durch Ultrazentrifugation;
- (g) Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (6,5 % Polyacrylamid) von durch Gelchromatographie aufgereinigten HtH1- und HtH2-Untereinheiten im Vergleich zum Ausgangsmaterial;
- (h,i) Gekreuzte Immunelektrophorese von chromatographisch aufgereinigten HtH-Untereinheiten; und

(j,m) Gekreuzte Immunelektrophorese der aufgereinigten HtH-Untereinheiten unter Verwendung von anti-KLH-Antikörpern aus Kaninchen, die für KLH1 bzw. KLH2 spezifisch sind.

Fig. 2 zeigt die Untersuchung der Untereinheiten-Organisation von HtH1, wobei für die Immunelektrophorese anti-HtH1-Antikörper aus Kaninchen verwendet wurden und die Anode sich auf der linken Seite befand:

- (a) Gekreuzte Immunelektrophorese nach limitierter Proteolyse von HtH1 mit Hilfe von Elastase;
- (b) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (7,5 % Polyacrylamid) von Elastase-gespaltener HtH1-Untereinheit;
- (c,d,g-j,l,n,p) Gekreuzte Immunelektrophorese der Elastase-Spaltprodukte der HtH1-Untereinheit;
- (e) Gekreuzte Immunelektrophorese nach limitierter Proteolyse von HtH1 mit Hilfe von V8 Protease;
- (f) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (7,5 % Polyacrylamid) von V8 Protease-gespaltener HtH1-Untereinheit und
- (k,m,o) Gekreuzte Immunelektrophorese nach limitierter Proteolyse von HtH1 mit Hilfe der drei angegebenen Proteasen.

Fig. 3 zeigt die Auftrennung von proteolytischen Spaltprodukten der Untereinheit HtH1 mit Hilfe von HPLC.

Fig. 4 zeigt die cDNA-Sequenz von HtH1 in Verbindung mit der Intronstruktur.

Fig. 5 zeigt die abgeleitete Primärstruktur von HtH1.

Fig. 6 zeigt die cDNA-Sequenz von HtH2 in Verbindung mit der Intronstruktur.

Fig. 7 zeigt die abgeleitete Primärstruktur von HtH2.

Fig. 8 zeigt die cDNA-Sequenz von KLH1 in Verbindung mit der Intronstruktur.

Fig. 9 zeigt die abgeleitete Primärstruktur von KLH1.

Fig. 10 zeigt die cDNA-Sequenz von KLH2 in Verbindung mit der Intronstruktur.

Fig. 11 zeigt die abgeleitete Primärstruktur von KLH2.

BEISPIELE

Material und Methoden

1. Gewinnen der Hämolymphe und Isolieren von Hämocyanin

Individuen des europäischen Seeohrs *Haliotis tuberculata* aus dem Bereich der französischen Atlantikküste wurden von S.M.E.L (Blainville sur Mer, Frankreich) und der Firma Biosyn (Fellbach, Deutschland) bereitgestellt. Die Tiere wurden in einem 300 l Seewasser-Aquarium bei 17 ° C gehalten und mit Braunalgen gefüttert. Zur Entnahme der Hämolymphe wurden die Seeohren in einem verschlossenen Plastiksack auf Eis gestellt. Nach einer Stunde waren große Volumina an Hämolymphe durch ihre Haut sezerniert worden. Es stellte sich heraus, daß das durch dieses Verfahren erhaltene Hämocyanin identisch ist mit dem Hämocyanin, das durch Einschneiden einer Mulde in den Fuß heruntergekühlter Meeresschnecken unter Verwendung einer Skalpellklinge gesammelt werden konnte. Die Blutzellen wurden von der Hämolymphe durch Zentrifugation bei 800 g über 30 min bei 4 ° C abgetrennt. Das gesamte Hämocyanin wurde sofort danach durch präparative Ultrazentrifugation bei 30000 g über 4 Stunden bei 4 ° C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das blaue Hämocyanin-Pellet wurde über Nacht in "Stabilisierungs-Puffer" (0,05 M Tris, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 0,15 M NaCl, 1 mM PMSF, pH 7,4) suspendiert und bei 4 ° C gelagert.

Intaktes HtH1 wurde unter Verwendung des von Harris et al., 1995, supra, beschriebenen Verfahrens aus dem gesamten HtH durch selektive Dissoziation von HtH2 in Ammoniummolybdat/Polyethylenglykol (1%/0,2%)-Lösung, pH 5,9 und nachfolgender Ultra-

zentrifugation erhalten. Das entstandene, teilweise aufgereinigte HtH1-Pellet wurde aufgelöst und durch Gelfiltration auf einer Biogel A15m-Vorrichtung zur Homogenität aufgereinigt. Der letzte Schritt ergab geringe Mengen von aufgereinigtem HtH2. Natives HtH1 und HtH2 wurde durch Dialyse gegen "Dissoziationspuffer" (0,13 M Glycin/NaOH, pH 9,6) bei 4 ° C über Nacht quantitativ in die Untereinheiten dissoziiert; die Gegenwart von EDTA war nicht erforderlich. 1 mM PMSF wurde bei jeder Stufe der Aufreinigung hinzugefügt, um die Proteolyse zu hemmen.

2. Elektronenmikroskopie

Konventionelles "negative staining" wurde mit dem Einzel-Tropfen-Verfahren (Harris und Horne in Harris, J.R. (Herausgeber) Electron microscopy in biology, (1991), IRL Press Oxford, S. 203-228) durchgeführt. Kohlenstoffträger-Filme wurde anfänglich über 20 Sekunden glühentladen, um sie hydrophil und für das Protein adsorptiv zu machen. Man lässt die Proteinproben an den Kohlenstofffilmen über 60 Sekunden adsorbieren. Sodann werden die Puffersalze durch sequentielles Waschen mit vier aufeinanderfolgenden 20 µl Wassertropfen entfernt. Die Gitter werden schließlich mit einem 20 µl Tropfen 5 % wäßrigen Ammoniummolybdate, enthaltend 1% Trehalose (pH 7,0) negativ gefärbt und bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wird ein Zeiss EM 900 Transmissionselektronenmikroskop verwendet.

3. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Immunelektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde gemäß des Verfahrens von Laemmli (Nature 227 (1970), 670-685) durchgeführt. Zur nativen PAGE wurde ein alkalisches System gemäß Markl et al. (1979) J. Comp. Physiol. 133 B, 167-175 mit einem 0,33 M Tris/Borat, pH 9,6 als Gelpuffer und 0,065 M Tris/Borat, pH 9,6 als Elektrodenpuffer verwendet. Gekreuzte und "crossed-line" Immunelektrophorese (IE) wurden gemäß Weeke (Scand. J. Immunol. 2 (1973), Suppl. 1, 47-56) bzw. Kroll (Scand. J. Immunol. 2, Suppl. 1 (1973), 79-81) durchgeführt. Kaninchenantikörper wurden von Charles River Deutschland (Kisslegg, Deutschland) gegen dissoziiertes Gesamt-HtH und aufge-

reinigtes HtH1 erzeugt. Das Immunisierungsverfahren wurde durchgeführt gemäß Markl und Winter (J. Comp. Physiol. 159B (1989), 139-151).

4. Limitierte Proteolyse und Isolierung der Fragmente

Die limitierte Proteolyse wurde bei 37 ° C in 0,13 M Glycin/NaOH, pH 9,6 durch Hinzufügen eines der nachstehenden Enzyme (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), die in 0,1 M NH₄HCO₃, pH 8,0 gelöst waren, durchgeführt: *Staphylococcus aureus* V8-Protease Typ XVII (8400), Papain Typ II aus Papaya-Milch (P-3125), Rinder-Pankreas-Elastase Typ IV (E-0258), Chymotrypsin und Trypsin. Die Hämocyanin-Konzentration lag zwischen 1 und 10 mg/ml. Die Endkonzentration des Enzyms betrug 2 % (Gewicht/Gewicht). Die Proteolyse wurde nach 5 Stunden durch Einfrieren auf -20 ° C beendet. Das HPLC-Verfahren wurde auf einer Vorrichtung von Applied Biosystems (BAI, Bensheim, Deutschland) durchgeführt, die mit einem Modell-1000S-Dioden-Array-Detektor ausgestattet war. Die proteolytischen Fragmente wurden auf kleine Mono-Q-Anionenaustauscher-Säule aufgetragen (Pharmacia, Freiburg, Deutschland), die mit 0,02 M Tris/HCl, pH 8,0 äquilibriert worden war und mit einem linearen Natriumchlorid-Gradienten (0,0 M - 0,5 M CaCl) im gleichen Puffer bei einer Flußrate von 1 ml/min eluiert wurden. Alternativ wurden die proteolytischen Fragmente durch Ausschneiden der Banden aus nativen PAGE-Gelen (Markl et al., 1979) J. Comp. Physiol. 133 B, 167-175 isoliert, nachdem sie zuvor mit dem Roti-White-System (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gemäß Fernandez-Patron et al. (1995) Anal. Biochem. 224, 203-211 invers-gefärbt worden waren. Zur nachfolgenden Spaltung mit einem zweiten Enzym wurden die isolierten Fragmente zuerst Übernacht gegen 0,13 M Glycin/NaOH, pH 9,6 dialysiert, um NaCl zu entfernen.

5. Aminosäuresequenzanalyse

Die durch das HPLC-Verfahren erhaltenen Proteine wurden in SDS-enthaltendem Probenpuffer denaturiert und durch SDS-PAGE (Laemmli, 1970, *supra*; 7,5 % Polyacrylamid) aufgetrennt. Um die Blockierung des NH₂-Terminus zu verhindern wurde 0,6 % (Gewicht/Gewicht) Thioglykolsäure zum Kathodenpuffer (Walsh et al., Biochemistry 27

(1988), 6867-6876) hinzugefügt. Die Proteinbanden wurden durch Elektro-Transfer auf ProBlot-Membranen (Applied Biosystems, Deutschland) in einer vertikalen Blotting-Kammer übertragen (25 mM Borat-Puffer, pH 8,8, enthaltend 2 mM EDTA; 10 min/100 mA, 15 min/200 mA, 12 h/300 mA). Der Nachweis der einzelnen Polypeptide auf den Membranen wurde mit der Ponceau-S-Färbung durchgeführt. Die interessierenden Polypeptid-Banden wurden ausgeschnitten und in einer 477A-Protein-Sequenzier-Vorrichtung von Applied Biosystems sequenziert. Die Mengen der auf die Sequenziervorrichtung aufgetragenen Polypeptide lag im unteren pmol-Bereich.

6. cDNA-Klonierung und Sequenzanalyse

Eine Lambda-cDNA-Expressionsbibliothek wurde aus Poly(A⁺)-RNA aus *Haliotis* Mantelgewebe unter Verwendung des Vektors Lambda ZAP Express[®] gemäß den Herstelleranweisungen (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) hergestellt. Die Klone wurden unter Verwendung von HtH-spezifischen Kaninchenantikörpern isoliert. Die Nukleotidsequenzierung wurde auf beiden Strängen unter Verwendung des Taq Dye deoxy Terminator[®]-Systems durchgeführt. Die Anordnung der Sequenzen wurde mit der Software CLUSTAL W (1.7)[®] und TREEVIEW[®] (Thompson et al., Nucl. Acids Res. 22 (1994), 4673-4680) durchgeführt.

Beispiel 1:

Isolierung von HtH und Auf trennung zweier unterschiedlicher Typen (HtH1 und HtH2)

Die Hämolymphe wurde aus adulten Seeohren gewonnen. Die Blutzellen wurden durch Zentrifugation entfernt und das Hämocyanin wurde sodann durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Das blaue Hämocyanin-Pellet wurde in "Stabilisierungspuffer" (pH 7,4) wieder aufgelöst und in der Elektronenmikroskopie untersucht (Figur 1a). Es bestand hauptsächlich aus typischen Di-Dekameren, begleitet von einem kleinen Anteil an Dekameren und Tridekameren. Die Denaturierung in 2 % SDS in Gegenwart reduzierender Substanzen und anschließender SDS-PAGE-Trennung ergab eine einzige Bande, die dem Polypeptid mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 370 kDa entsprach, welches nur geringfügig unterhalb des scheinbaren Untereinheiten-Gewichts von KLH

(Figur 1b) liegt. Die vollständige Dissoziation der Oligomere wie der Di-Dekamere in die nativen Polypeptide (Untereinheiten) wurde erreicht durch Übernacht-Dialyse von HtH gegen "Dissoziationspuffer" (pH 9,6). Natives PAGE-Verfahren, das auf diese Proben angewendet wurde, ergab eine Haupt- und eine Neben-Komponente (Figur 1c). Die gekreuzte Immunelektrophorese (gekreuzte IE) unter Verwendung von gegen aufgereinigtes Gesamt-HtH-erzeugten polyklonalen Kaninchen-Antikörpern zeigte zwei Komponenten, die immunologisch unterschiedlich sind, jedoch die klassische Reaktion einer teilweise immunologischen Identität aufweisen (Figur 1d). Ihre präparative Isolierung (Figur 1e-i) zeigte, daß sie die Untereinheiten von zwei unterschiedlichen HtH-Typen darstellen, bezeichnet als HtH1 und HtH2, und die Muster der nativen PAGE- und gekreuzten IE-Verfahren konnten jeder einzelnen zugeordnet werden (Figur 1c, d).

Die Auftrennung von HtH1 und HtH2 wurde gemäß des Verfahrens zur selektiven Dissoziation gemäß Harris et al., 1995, supra, durchgeführt. In Ammoniummolybdat/Polyethylenglykol war HtH1 im Oligomeren-Zustand (Di-Dekamere) vollständig stabil, wohingegen HtH2 vollständig in die Untereinheiten dissoziierte (Figur 1e). Dies ermöglichte die quantitative Sedimentation von HtH1 in der Ultrazentrifuge, wohin gegen der größte Teil des HtH2 im Überstand verblieb. Aus dem wieder aufgelösten Pellet wurden große Mengen an HtH1 durch Gelfiltrationschromatographie zur Homogenität aufgereinigt, welche auch geringe Mengen an reinem HtH2 ergab (Figur 1f). Die Fraktionen wurden durch native PAGE (Figur 1g) und gekreuzte IE (Figur 1h, i) untersucht. Das Verfahren der selektiven Dissoziation von HtH2 entfernte sämtliche Tri-Dekamere aus den Proben, welches nahelegt, daß die letzteren aus HtH2, jedoch nicht aus HtH1 aufgebaut sind (Figur 1e). Das selektive Dissoziationsverhalten von HtH2 und auch die Fähigkeit, Aggregate zu bilden, die größer als *in vivo* -Di-Dekamere sind, entspricht den Eigenschaften von KLH2. Umgekehrt ähnelt die Stabilität von HtH1 unter diesen Bedingungen und seine Unfähigkeit, sich zu größeren Aggregaten als Di-Dekameren zu assemblieren, dem Verhalten von KLH1. Diese Verwandtschaft wird weiter belegt durch die Reaktion von Anti-KLH1 bzw. Anti-KLH2 Antikörpern gegen die beiden HtH-Typen (Figur 1j-m).

Beispiel 2:**Analyse der Organisation der HtH1-Untereinheit**

Die acht funktionellen Einheiten (FU's, häufig als "funktionelle Domänen" bezeichnet), die eine Mollusken-Hämocyanin-Untereinheit bilden, unterscheiden sich in der Primärstruktur und weisen keine immunologische Kreuz-Reaktivität auf, wie sich aus gekreuzter IE ergibt. Im Fall der aufgereinigten HtH1 Untereinheit (Figur 1g, h) wurden geringe Konzentrationen fünf unterschiedlicher Proteasen (Elastase, V8-Protease, Papain, Trypsin und Chymotrypsin) verwendet, welche die Peptid-Bindungen zwischen benachbarten FU's von KLH1 und KLH2 gespalten hatten (Gebauer et al., 1994, supra, Söhnigen et al., 1997, supra). Die Spaltprodukte wurden durch gekreuzte IE und SDS-PAGE (Fig. 2) untersucht. Elastase-Behandlung erzeugt acht einzelne FU's, abgeleitet aus der Anzahl an unterschiedlichen Immunpräzipitations-Gipfeln in der gekreuzten IE (Fig. 2a) und mit dem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 50 kDa des Hauptteils der Spaltprodukte in SDS-PAGE (Fig. 2b). Ein weiterer Präzipitationsgipfel wurde als FU-Dimer erkannt, welches durch unvollständige Spaltung des Segments ab (Fig. 2a) entstand. Durch HPLC-Verfahren mit einer Mono-Q-Säule (Fig. 3a) wurden zwei der Elastase-Spaltprodukte in einer ausreichenden Reinheit erhalten, um durch "crossed-line-IE" ihre klare Zuordnung zu zwei der acht Präzipitationsgipfel (Fig. 2c,d) zu ermöglichen. Die anderen vier Proteasen wiesen unterschiedliche Spaltmuster auf, die aus Gemischen einzelner FU's und größerer Fragmente, enthaltend zwei, drei oder mehrere FU's bestanden (z.B. Fig. 2 e,f). Viele von ihnen waren durch das HPLC-Verfahren in ausreichender Menge angereichert (Fig. 3b-e), um ihre Identifikation in ihren entsprechenden SDS-PAGE- und gekreuzten IE-Mustern zu ermöglichen. Eine Anzahl dieser Komponenten wurde N-terminal durch Blot-Transfer von SDS-Gelen auf ProBlot®-Membrane (Tabelle I) sequenziert. Die Resultate wurden mit N-terminalen Sequenzen verglichen, die aus dem scheinbar orthologen Protein in *Megathura crenulata*, KLH1 (Tabelle I), erhalten worden waren, von dem die vollständige FU-Anordnung verfügbar ist (Söhnigen et al., 1997, supra; vgl. Fig. 5b). Das Ergebnis des gesamten Ansatzes führte zur Bestimmung der vollständigen FU-Anordnung innerhalb der HtH1-Untereinheit (Fig. 2a).

Insbesondere ergab die Spaltung der HtH1-Untereinheit (1-abcdefgh) mit V8-Protease vier Präzipitationsgipfel in der gekreuzten IE (Fig. 2e). Das SDS-PAGE-Verfahren zeigte

fünf unterschiedliche Fragmente (Fig. 2f): 220 kDa (5 FU's), 185 kDa(4 FU's), 100 kDa (2 FU's), 55 kDa(1 FU) und 46 kDa(1 FU). Das 100 kDa-Fragment wurde durch das HPLC-Verfahren (Fig. 3b) isoliert und durch N-terminale Sequenzierung als 1-ab identifiziert, da die Sequenz identisch zu derjenigen der intakten Untereinheit war (Tabelle I). In dem "crossed-line" IE-Verfahren verschmolz 1-ab mit drei Präzipitationsgipfeln des Elastase-Spaltmusters. Aufgrund der Auswertung ergab sich, daß sie die Fragmente 1-ab, 1-a bzw. 1-b darstellen (Fig. 2g). ~~Jedoch verblieb es unklar, welcher Gipfel 1-a und welcher 1-b darstellt.~~ In einem zweiten Schritt wurde das HPLC-aufgereinigte 1-ab durch Elastase in seine Komponenten-FU's gespalten, aus denen eine durch das native PAGE-Gel-Streifenverfahren eluiert werden konnte und dem Elastase-Muster durch das "crossed-line" IE-Verfahren (Fig. 2h) zugeordnet und N-terminal sequenziert wurde. Diese Komponente wies die gleiche N-terminale Sequenz wie die gesamte Untereinheit auf und war deshalb identisch zu 1-a. Somit ist die zweite FU des 100 kDa-Fragments 1-b (Fig. 2a; Tabelle I). Ebenso wurden HPLC-aufgereinigtes 1-c und 1-h erhalten (Fig. 3b), durch N-terminale-Sequenzähnlichkeiten zu den entsprechenden FU's in KLH1 (Tabelle I) identifiziert und durch das "crossed-line" IE-Verfahren ihren entsprechenden Präzipitationsgipfeln in dem Elastase-Muster zugeordnet (Fig. 2i,j). Weiterhin wurden 1-a, 1-b, 1-c und 1-h identifiziert (Fig. 2a). Unter Verwendung von Papain zur Untereinheiten-Spaltung wurden fünf unterschiedliche Gipfel in dem gekreuzten IE-Verfahren (Fig. 2k) erhalten. Aus einer solchen Probe wurde ein 100 kDa-Fragment (2 FU's) durch das HPLC-Verfahren (Fig. 3c) aufgereinigt, welches gemäß des "crossed-line" IE-Verfahrens das bereits identifizierte FU 1-h und eine der vier noch nicht identifizierten FU's enthielt und deshalb 1-gh darstellen muß (Figs. 2k, 3c). Tatsächlich wies dieses Fragment eine N-terminale Sequenz auf, die Ähnlichkeiten zu KLH1-g (Tabelle I) zeigte. Zur weiteren Bestätigung wurde das HPLC-aufgereinigte Fragment 1-gh mit Elastase in seine Bestandteil-FU's gespalten, aus denen 1-g aufgereinigt und durch N-terminale Sequenzierung identifiziert wurde. Es wurde durch "crossed-line" IE-Verfahren seinem Gipfel in dem Elastase-Spaltmuster zugeordnet (Fig. 2l).

Das 220 kDa-Fragment aus der V8-Protease-Spaltung (Fig. 2e, f) wurde HPLC-aufgereinigt (Fig. 3b) und fusionierte im "crossed-line" IE-Verfahren mit 1-h, 1-g und drei noch nicht identifizierten Gipfeln des Elastase-Spaltmusters. Weiterhin wurde das 185

kDa-Fragment in ausreichender Reinheit erhalten (Fig. 2e, f; 3b), und es wurde gezeigt, daß sie die gleichen Komponenten mit Ausnahme von 1-h enthielten. Dies legte nahe, daß das 22 kDa und das 185 kDa-Fragment 1-defgh bzw. 1-defg sind. Tatsächlich war die N-terminale Sequenz praktisch identisch und zeigte weiterhin Ähnlichkeit zu KLH1-d (Tabelle I). Die Spaltung der HtH1-Untereinheit mit Trypsin ergab eine Vielzahl an Komponenten in dem Molekulargewichtsbereich von ein bzw. zwei FU's (Fig. 2m). Mehrere der Komponenten wurden in HPLC-Fraktionen angereichert (Fig. 3d). Ein 100 kDa-
~~Fragment erwies sich als besonders nützlich, da es die gleiche N-terminale Sequenz wie das Fragment 1-defg aus der V8-Protease-Spaltung aufwies (Tabelle I); deshalb sollte das 100 kDa-Fragment 1-de darstellen. In dem "crossed-lined" IE-Verfahren fusionierte diese Komponente mit zwei der drei noch nicht identifizierten FU-Gipfeln des Elastase-Spaltmusters (Fig. 2n), welches deshalb 1-d und 1-e darstellen sollte, und somit eine einzige Möglichkeit für 1-f übrig ließ. Das "crossed-line" IE-Verfahren zeigte auch, daß in der 1-de Fraktion weiterhin FU 1-f vorhanden war (Fig. 2n). Die Identifikation von 1-f bestätigte durch Spaltung der Untereinheit mit Chymotrypsin (Fig. 2o) und nachfolgendem HPLC-Verfahren (Fig. 3e). Diese Spaltung ergab unter anderem ein 95 kDa-Fragment (2 FU's) welches im "crossed-line"-IE-Verfahren mit 1-g und einem zweiten Gipfel (Fig. 2p) fusionierte und deshalb entweder 1-gh (welches ausgeschlossen werden konnte, da 1-h bereits identifiziert war), oder 1-fg (welches sinnvoll erscheint aufgrund des weiteren betreffenden Peaks, der zu dem verbleibenden Kandidaten identisch war) sein könnte. Tatsächlich zeigte dieses Fragment eine neue N-terminale Sequenz, welche in gewisser Weise zu KLH1-f ähnlich ist (Tabelle I). Das letzte Problem bestand nun darin, die zwei verbleibenden FU-Gipfel 1-d bzw. 1-e zuzuordnen. Dies wurde unter Verwendung von HPLC-isolierten FU's aus Proben gelöst, in denen die Untereinheit mit Elastase gespalten worden war. (Fig. 2c, d; 3a). Die saurere Komponente in dem gekreuzten IE-Verfahren war 1-d abgeleitet aus seiner N-terminalen Sequenz, welche identisch ist mit der von 1-defgh (Fig. 2c; Tabelle I), wohingegen die basischere Komponente des 1-d/1-g-Paars eine neue N-terminale Sequenz (Tabelle I) aufwies und deshalb 1-e (Fig. 2a) sein mußte. Somit war die Struktur der funktionellen Einheiten der Untereinheit HtH1 aufgeklärt.~~

Beispiel 3:

Vergleich der Molekulargewichte und N-terminalen Sequenzen der biochemisch isolierten funktionellen Einheiten (FU's) aus HtH1 und KLH1. Die unterschiedlichen FU's, jede mit einer intakten binukleären Kupfer-Bindungsstelle, wurden durch limitierte Proteolyse als globuläre Segmente aus ihrer größeren Einheit freigesetzt; vgl. Abschnitt "Isolierung und Analyse der Einheiten aus HtH1". Die KLH1-Daten wurden aus Söhngen et al., supra, entnommen. Die Zuordnung als tatsächliche Einheit erfolgte aufgrund des Molekulargewichtes und des immunologischen Verhaltens (vgl. Fig. 2). Das ungewöhnlich niedrige Molekulargewicht von isoliertem HtH1-d könnte bedeuten, daß ein großes Peptid C-terminal abgespalten wurde.

TABELLE I

| Funktionelle Einheit | Massen (kDa) | N-terminale Sequenz |
|----------------------|--------------|---|
| HtH1-a | 53 | DNVVRKDVS H LTDEVQ |
| KLH1-a | 50 | ENLVRKDVERL |
| HtH1-b | 48 | ? |
| KLH1-b | 45 | ? |
| HtH1-c | 46 | FEDEKHS L R I R K NVD S L T PEENTNERLR |
| KLH1-c | 45 | KVPRSRLIR K NVD R LTPSE |
| HtH1-d | 40 | VEEV T GASH I R K N L N D LNTGEM |
| KLH1-d | 50 | EVT S ANR I R K N I ENLS |
| HtH1-e | 49 | I L DHDHEEE I LVR K NI I D L SP |
| KLH1-e | 50 | ? |
| HtH1-f | 50 | KLNSRKHTPNRVR H ELSS L SSRDIASLKA |
| KLH1-f | 45 | HHLSXNKVRHDLSTL |
| HtH1-g | 45 | DHQSGSIAGSGVRKD V NTLT K AETDNLRE |
| KLH1-g | 45 | SSMAGHFVRKDINTLTP |
| HtH1-h | 55 | DEHHDDR L ADVLIR K EVD F LSLQEANA I KD |
| KLH1-h | 60 | HEDHHEDILVR K NIHSL |

Beispiel 4:**Klonierung von Hämocyanin-cDNA**

1. Zur Klonierung der cDNA von Hämocyanin wurde mRNA aus dem Mantelgewebe des jeweiligen Mollusken isoliert. Der erste cDNA-Strang wurde durch reverse Transkription mit Oligo(dT) als Primer erhalten. Der zweite Strang wurde durch konventionelle Synthese mit random Primern erhalten. Die so erhaltene cDNA wurde in einen Lambda-Expressionsvektor kloniert unter Bildung einer cDNA-Expressionsbibliothek. Unter Verwendung eines anti-Hämocyanin-Antikörpers wurde die Bibliothek unter geeigneten Bedingungen abgesucht, wobei positive Klone erhalten wurden. Diese positiven Klone wurden isoliert, sequenziert und charakterisiert.
2. Aus dem N-terminalen Bereich eines erhaltenen positiven Klons wurde eine cDNA-Sonde hergestellt, mit der die cDNA-Bibliothek abgesucht wurde. Die erhaltenen positiven Klone werden wiederum isoliert, sequenziert und charakterisiert.
3. Um noch weiter 5' gelegene Sequenzen zu erhalten, wurde eine weitere Expressionsbibliothek aus cDNA hergestellt, die mit Hilfe einer Kombination von Hämocyanin-spezifischen und „random“-Primern erhalten wurde. Diese cDNA-Bibliothek wurde mit cDNA-Sonden, die den „N-terminalen“ Bereichen der unter (2.) erhaltenen positiven Klone entsprechen, abgesucht. Die erhaltenen positiven Klone wurden isoliert, sequenziert und charakterisiert.

Beispiel 5:**Klonierung von Hämocyanin-Genen**

Genomische DNA wurde gemäß Standardverfahren isoliert. Die PCR-Reaktion wurde mit Hilfe von Hämocyanin-spezifischen Primern durchgeführt, um die Genabschnitte der interessierenden Hämocyanine zu amplifizieren. Die erhaltenen Amplifikationsprodukte wurden in einen geeigneten Vektor (beispielsweise pGem T oder pGem T easy (Promega, Mannheim) kloniert, sequenziert und charakterisiert.

Beispiel 6:**Rekombinante Expression von Hämocyanin**

Mit einem cDNA-Klon, der die kodierende Sequenz für HtH-1d enthält, wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt, um spezifisch die kodierende Sequenz der Domäne 1d zu amplifizieren. Als Primer wurden synthetisch hergestellte Oligonukleotide verwendet.

Primer 1 (stromaufwärts) umfaßt sechs Nukleotide des Endes der Domäne HtH-1c, eine SacI-Schnittstelle und 12 Nukleotide des Endes der Domäne HtH-1d.

Primer 2 (stromabwärts) umfaßt sechs Nukleotide des Anfangs der Domäne HtH1-e, eine SalI-Schnittstelle und eine HtH1-d spezifische Sequenz.

| | | | |
|------------------|----|--------|------|
| PCR-Bedingungen: | 2 | min | 95°C |
| | 30 | sec | 95°C |
| | 30 | sec | 55°C |
| | 1 | min | 72°C |
| | 35 | Zyklen | |
| | 10 | min | 72°C |

Das Amplifikat wurde in dem pGEM T easy PCR Klonierungsvektor (Promega) in XL-1 Blue (Stratagene) kloniert. Nach Isolation des rekombinanten Plasmids und Restriktion mit SacI und SalI konnte die cDNA der Domäne 1d isoliert werden. Der Expressionsvektor pQE30 (Qiagen) wurde ebenfalls mit den entsprechenden Enzymen restringiert.

Anschließend wurde die Ligation zwischen der HtH-1d-cDNA (restringiert mit SacI und SalI) und pQE (restringiert mit SacI und SalI) durchgeführt. Somit ist eine gerichtete Klonierung der cDNA, kodierend für HtH-1d, in einen Expressionsvektor möglich. Die Expression von HtH1-d in pQE in XL-1 Blue erfolgt gemäß Herstelleranleitung. Die Expression weiterer HtH1-, HtH2- oder KLH1- oder KLH2-Domänen kann analog erfolgen.

22.00 29.00

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Biosyn Arzneimittel GmbH

<120> Nukleinsäuremolekül, kodierend für eine Hämocyanin-kodierende Nukleinsäuresequenz

<130> P30370-01996

<140>
<141>

<160> 38

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1
<211> 1228
<212> DNA
<213> Hali

```
<210> 2
<211> 1210
<212> DNA
<213> Haliothis tuberculata
```

```
<400> 2
atcagaaaaaa atgtcgacag cttgactcct gaagaaaacaa atgaactgcg taaagccctg 60
gagcttcttg aaaatgatca tactgttaggt ggattcaatc agcttggcgc cttccatgga 120
gagcctaaat ggtgccctaa tcctgaagcg gagcacaagg ttgcctgctg cgttcatggc 180
atggccgttt tccccacattg gcacaggctt cttgctctcc aggccggagaa tgctcttaga 240
aagcatgggt acagtgggtgc tctaccatac tgggattgga ctcgccccct ttcccaactt 300
cctgatctgg ttagtcatga gcagtatatac gatccttccg accatcacgt gaagcataac 360
ccgtggttca atggccacat cgatacagta aatcaggata ccaccagaag cgtacgggag 420
gatctttatc aacaacctga atttggacat ttcacggata ttgctcaaca agtcctctta 480
gcattagaac aagatgactt ctgttcgtt gaagtgcagt atqagattc ccataattt 540
```

22.00.00

| | | | | | | |
|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| atccatgcac | ttgttaggagg | aaccgacgct | tatggcatgg | catcgctgag | atatacagca | 600 |
| tacgatccaa | tctttttctt | gcatcattca | aacaccgaca | ggatctgggc | tatttggcaa | 660 |
| tccctgcaaa | aatacagagg | caaaccgtac | aacactgcca | actgcgccat | agaatctatg | 720 |
| agaaggcccc | tgcaaccatt | tggactaagc | agtgcattta | accctgacag | aatcaccaga | 780 |
| gagcatgcta | tcccgttta | tgtcttcaac | tatagagata | accttcattta | cgtatatgat | 840 |
| accctgaaat | ttaatggttt | gtcgatttca | caacttgata | gagagctgga | aaaaatcaag | 900 |
| agtcacaaaa | gagtatttgc | tggattcttg | ctgtcgggga | ttaaaaaatc | tgctcttgtg | 960 |
| aaattcgaag | tttgtactcc | acctgataat | tgtcataaaag | caggggagtt | ttatctactc | 1020 |
| ggggacaaaa | acgagatggc | ttgggcctat | gaccgacttt | tcaagtatga | tattactcag | 1080 |
| gttctggaag | caaaccatct | acacttctat | gatcatctct | tcattcgcta | cgaagtcttt | 1140 |
| gatcttaaag | gagtgagttt | ggaaactgac | ctgttccaca | ctgcaaatgt | ggtacatgat | 1200 |
| tccggcacag | | | | | | 1210 |

<210> 3

<211> 1239

<212> DNA

<213> *Haliotis tuberculata*

<400> 3

| | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|------|
| gcacccggta | tctgtataac | tacgttgaag | aagttactgg | ggccagtc | atcaggaa | 60 |
| atttgaacga | cctcaatacc | ggagaaaatgg | aaagccttag | agctgcttc | ctgcata | 120 |
| aggacgacgg | aacatata | tctattgccc | agtaccatgg | caaaccaggc | aatgtcaat | 180 |
| tgaatgatca | taatattg | tgttgtgtcc | atggtatg | taccttcccc | cagtggcaca | 240 |
| gactgtatgt | ggttcagg | gagaatg | tcctaaacag | gggatctgg | gtggctgtt | 300 |
| cttactgg | gtggactg | cccatagacc | atctac | tttcatttgat | gatgcaacat | 360 |
| acttcaattc | ccgacaacag | cggta | ctaacc | cttcagg | aaggta | 420 |
| ttgaaaacgc | agt | aggac | aagg | cttcaact | gattat | 480 |
| atgagaatgt | tttacttg | ctggag | aaaattat | tgactt | attcag | 540 |
| agcttgttca | taacgc | cattccat | tgggagg | agggcag | tccatgt | 600 |
| ccctggacta | ttctgcgtt | gatcc | tcttc | tcatgcca | acggac | 660 |
| tgtggcaat | ctggcagg | ctaca | tccgaga | gcctt | gaagcga | 720 |
| gtgcaatcaa | cctcatg | caacc | actga | tgatcc | gagaatc | 780 |
| acaatgtcac | tttgaat | tcaaa | aggacgg | cgactacc | aaccact | 840 |
| gataacaagta | tgacaac | gagtt | actt | cccaag | gtgctac | 900 |
| tgaagcaaag | gagacat | gacag | gtgt | ccttctt | aacatagg | 960 |
| cttctgtga | cataactat | tacat | tgcctgac | acggcgt | aatgact | 1020 |
| gtcatgaggc | gggaacat | tata | gaggcggaa | agagatgc | tttatctt | 1080 |
| accgttgta | taaattt | atcac | cactgca | gtttagg | aagctgc | 1140 |
| gtggagttt | cgaactgg | ctt | aggcata | cggttcc | ctggat | 1200 |
| ataccttga | tccaa | actat | ac | ctggaa | cag | 1239 |

<210> 4

<211> 1260

<212> DNA

<213> *Haliotis tuberculata*

<400> 4

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| ataccatata | ctggaccac | gaccatgagg | aagagatact | tgtcaggaag | aatataattg | 60 |
| attttagcccc | aagggagagg | gtttctctag | tcaaagctt | gcaaagaatg | aagaatgatc | 120 |
| gctccgctga | tgggtaccaa | gcccattgcct | ctttccatgc | cctgccacca | ctctgtccca | 180 |
| atccatctgc | agctcacgg | tatgcttgct | gtgtccatgg | catggctaca | tttccccagt | 240 |
| ggcacagact | gtacactgtt | cagggtcagg | atgcccgtag | gagacatgg | tcacttgtt | 300 |
| gtattcctta | ctgggactgg | acaaaaccag | tcaacgagtt | acccgagctt | ctttcttcag | 360 |
| caacattta | tcatccaaatc | cggaatatta | atatttcaaa | tccattcctc | ggggctgaca | 420 |
| tagaatttga | aggaccgggc | gttcatacag | agaggcacat | aaatactgag | cgctgtttc | 480 |
| acagtgggga | tcatgacgga | taccacaact | ggttcttcga | aactgttctc | tttgctttgg | 540 |
| aacaggaaga | ttactgcgt | tttggaaatac | aatttgagat | agcccataat | ggcatccaca | 600 |
| catggattgg | tggaaagcgca | gtacatggca | tgggacacct | tcactatgca | tcatatgatc | 660 |
| caattttcta | catccaccat | tcacagacgg | acagaatatg | ggctatttgg | caagagctgc | 720 |

22.00.00

31

agaagtacag gggcttatct gggtcggaag caaactgtgc cattgaacat atgagaacac 780
ccttgaagcc ttttagctt gggccaccct acaatttcaa tagtcatacg caagaatatt 840
caaagcctga ggacacgtt gactataaga agtttggata cagatatgat agtctggaa 900
tggagggcg atcaatttct cgcattgtg aacttatcca gcagagacag gagaaagaca 960
gaactttgc agggtcctc cttaaagggtt ttggtacatc cgcatctgtg tcattgcaag 1020
tttgcagagt tgatcacacc tgtaaagatg cgggctattt cactattctg ggaggatcag 1080
ccgaaatgcc atggcggtc gacaggctt ataagtatga cattactaaa actcttcacg 1140
acatgaacct gaggcacgag gacacottct ctatagatgt aactatcacg tcttacaatg 1200
aacagttact ctcggagac ctcatccaga cggccctccat tatattgtt cctggacgccc 1260

<210> 5
<211> 1251
<212> DNA
<213> *Haliotis tuberculata*

<400> 5
ataaaactcaa ctcacggaaa catacaccta acagagtccg ccatgagcta agtagcctta 60
gttcccgta catagcaagc ttgaaggcag ctttgacaag ccttcaacat gataatggaa 120
ctgatggta tcaagctatt gctgccttcc atggcggtcc tgcgcagtgc cacgagccat 180
ctggacgtga gatgcctgt tgcatccacg gcatggcgac gtttcctcac tggcaccgg 240
tgtacactt gcagtggag caagcgctgc gcagacacgg gtccagtttgc gctgttccat 300
actgggactg gaccaagcca atcaccgaac tgccacacat tctgacagac ggagaatatt 360
atgacgttg gcaaaatgcc gtcttgcca atccgttgc aagaggttat gtgaaaattt 420
aagatgcatt tacggtgaga aatgtccagg aaagtctgtt caaaatgtca agttttggaa 480
agcactcgct tctgtttgac caggcttgc tggctcttgc acaaactgac tactgtgact 540
tcgaagttca gttgaagtg atgcataaca cgatccatc tctcgtagga gggcgtaaaa 600
cgtacgcctt ctcctcttc gagtattcct catacgatcc aatcttctt attcaccact 660
cgtttggta caaaatatgg gctgtatggc aagaactgca aaggaggaga catctacagt 720
ttagaacagc tgattgtgt gtggcctca tgggtcaggc aatgaggcct ttcaacaagg 780
atttcaacca caactcggtc accaagaagc acgcgtccc taatacagta tttgattatg 840
aagatcttg gctataactat gacaaccttgc aatcagtttgc tttaaacttgc aatgagatcg 900
aggcgtaat agcaaaacgc aagtccatc ctagagtttgc tgctgggttc ctgttgggg 960
gatttaggaac ttccgctgtat atacatctgg aaatttgcac gacatcgaa aactgcccatt 1020
atgctgggtt gattttcatc cttggagggtt ctgcagagat gcattggca tacaaccggcc 1080
tctacaagta tgacattaca gaagcattgc aggaatttgc catcaaccctt gaagatgttt 1140
tccatgtga tgaaccattt ttcttgaggc tgctgggttgc tgctgtgaat ggaactgtca 1200
ttccatcgcc tcatcttcac cagccaaacgc taatctatgc accaggcgaa g 1251

<210> 6
<211> 1209
<212> DNA
<213> *Haliotis tuberculata*

<400> 6
atcaccatga cgaccatcag tcgggaagca tagcaggatc cggggtccgc aaggacgtga 60
acaccttgc taaggcttag accgacaacc tgagggaggc gctgtgggggt gtcattggcag 120
accacgggtcc caatggcttt caagctattt cttgcatttca tggaaaacca gctttgtgtc 180
ccatgcctga tggccacaac tactcatgtt gtactcacgg catggctacc ttcccacact 240
ggcatcgctt ctacaccaag cagatggagg atgcaatgag ggcgcattggg tctcatgtcg 300
gcctgcccata ctgggactgg actgctgcct tcacccaccc gccaacactg gtcaccgaca 360
cggacaacaa ccccttcaa catggacaca ttgattatct caatgtcagc acaactcgat 420
ctccccgaga catgctgtt aacgaccccg agcatggatc agagtcgttc ttctacagac 480
aagtctctt agctctggaa caaactgtt tctgcaaaatt cgaagttcag tttgagataa 540
cccacaatgc catccatttc tggacagggtt gcccacagcccc ctacggaaatg tccactctcg 600
acttcactgc ctacgatctt ctcttctggc ttcaccactc caacaccgac agaatctggg 660
ctgtctggca agctttgcaaa gaatacagag gacttccata caaccatgcc aatttgagata 720
tccaggcaat gaaaacgccc ctgaggccctt tcagtgacga tatcaaccac aaccctgtca 780
caaaggctaa cgccaaacgc ttagatgtgt tcgagttataa tcgggttgc gttccagttacg 840
acaacctcat cttccatggaa tacagtatttgc cggaaacttgc tcgcgtgtttt gaagaaagaa 900

20.000.00
32

aggaggagga cagaatattt gctgccttcc ttctcagtgg aatcaagcgt agtgctgatg 960
tagtgttcga catatgccag ccaggacacg aatgtgtgtt cgccaggact tttgcgattt 1020
tgggagggga gctagaaaatg ccctggcct ttgacagact gttccgctat gacatcacca 1080
aggtgatgaa gcagctacac ctgaggcatg actccggactt tacgttcagg gtgaagattg 1140
tcggcactga cgaccacgag ctccctccg acagtgtcaa agcaccaact attgaattt 1200
aacctggcg 1209

<210> 7
<211> 1535
<212> DNA
<213> *Haliotis tuberculata*

<400> 7

tgcacagagg cgggaagcac gaagatgaac accatgatga cagactcgca gatgtcctga 60
taaggaaaga agttgacttc ctctccctgc aagaggccaa cgcaattaag gatgcactgt 120
acaagctcca gaatgacgac agtaaaggcg gctttgaggc catagctggc tattcacgggt 180
atcctaataat gtgtccagaa agaggttaccg acaagtatcc ctgctgcgtc cacggaatgc 240
ccgtgttccc ccactggcat cgcctgcaca ccattcagat ggagagagct ctgaaaaacc 300
atggctctcc aatgggtatt ccttactggg attggacaaa gaagatgtcg agtcttccat 360
ctttctttgg agattccagc aacaacaacc ctttctacaa atattacatc cggggcgtgc 420
agcacgaaac aaccaggac gttaatcaga gactctttaa tcaaaccagg tttggtaat 480
ttgattacct atattaccta actctgcaag tcctggagga aaactcatac tgtgactttg 540
aagttcagta tgagatcctc cataacgcgg tccactccctg gcttggagga actggacagt 600
attccatgtc taccctggag tattcagcct tcgaccctgt ctcatgatt caccactcga 660
gtttggatag aatctggatc ctttggcaga agttgcacaaa gataagaatg aagccttact 720
acgcattgga ttgtgctggc gacagactta tggaaagaccc cctgcattccc ttcaactacg 780
aaaccgttaa tgaagatgaa ttccacccga tcaactctt cccaaagcata ctgtttgacc 840
actacagggtt caactatgaa tacgataaca tgagaatcag gggtcaggac atacatgaac 900
ttgaagaggt aattcaggaa ttaagaaaaca aagatcgtat atttgctgtt tttgtttgt 960
cgggcttacg gatatcagct acagtggaaag tattcattca ttggaaaaac gatacaagtc 1020
acgaagaata tgcaggagaa tttgcagttt tgggaggtga gaaggagatg cctgtggcat 1080
atgaaagaat gctgaaattt gacatctccg atgctgtaca caagttcac gtgaaagatg 1140
aagacatccg ttttagatgt gttgttactg ctttacaacgg tgacgttggt accaccaggc 1200
tgtctcagcc attcatgtc caccgtccag cccatgtggc tcacgacatc ttggtaatcc 1260
cagtaggtgc gggccatgac ctccgccta aagtctgtt aaagagcggc accaaagtgc 1320
agtttacacc aatagattcg tcggtgaaaca aagcaatggt ggagctgggc agctatactg 1380
ctatggctaa atgcatcgat cccctttct cttaccacgg ctttgaactg gacaaagtct 1440
acagcgtcga tcacggagac tactacattt ctgcaggtac ccacgcgttg tgtgagcaga 1500
acctcaggct ccacatccac gtggaaacacg agtag 1535

<210> 8
<211> 317
<212> DNA
<213> *Haliotis tuberculata*

<400> 8

gtttctttct gtcacatatt ggtacatcag cgaatgttga aatcattata gaccatggga 60
ctcttcatac ctccgtggc acgtttgctg ttcttggcgg agagaaggag atgaaatggg 120
gatttgaccg tttgtacaaa tatgagatata cagatgaact gaggcaactt aatctccgtg 180
ctgatgtatgt tttcagcatc tctgttaaag taactgtatgt tgatggcagt gagctgcct 240
ctgaactcat cccatctgtt gctatcatct tcgaacgaag ccatattgac catcaggacc 300
cgcacatcatcacaatc 317

<210> 9
<211> 1219
<212> DNA
<213> *Haliotis tuberculata*

<400> 9

22,000.00

33

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|------|
| attaggaaaa | atgttgataa | tcttacaccc | gaggaaaattta | attttctggag | gcggggcaatgg | 60 |
| gcagacccttc | aatcagacaa | aaccgcgggt | ggattccagc | aaattgtctgc | ttttcacgggg | 120 |
| gaaccctaaat | ggtgcggcaag | tcccgatgtc | gagaagaagt | tctcctgctg | tgtccatggaa | 180 |
| atggctgtct | tccctcaactg | gcacagactc | ctgaccgtgc | aaggcgagaa | tgccctgaga | 240 |
| aagcatggat | gtctcgggagc | tctccctac | tgggactggaa | ctcgccccc | gtctcaccta | 300 |
| cctgattttgg | ttttggtaag | tagcagaact | acaccgatgc | catattccac | cgtggaaagcc | 360 |
| cgaaaacccct | ggtacagcgg | ccatattgtat | acagttggtg | ttgacacaac | aagaagcgtc | 420 |
| cgtcaagaac | tgtatgaagc | tcctggattt | ggccattata | ctggggtcgc | taagcaagtgg | 480 |
| cttctggctt | tgagcgagga | tgacttctgt | gattttgaag | tccagtttga | gatagctcac | 540 |
| aatttcattc | acgctcttgc | cggcggaaagc | gagccatatg | gtatggcgtc | actccgttac | 600 |
| actacttatg | atccaaattt | ctacctccat | cattctaaca | ctgacagact | ctgggctata | 660 |
| tggcaggctc | tacaaaagta | cagggggcaaa | ccttacaatt | ccgccaactg | cgccattgtct | 720 |
| tctatgagaa | aacccttaca | accctttggt | ctgactgtat | agatcaaccc | ggatgtatgag | 780 |
| acaagacagc | atgctgttcc | tttcagtgtc | tttgattaca | agaacaactt | caattatgaa | 840 |
| tatgacaccc | ttgacttcaa | cggactataca | atctcccaagc | tggaccgtga | actgtcacgg | 900 |
| agaaaagtctc | atgacagagtt | atttgccgg | tttttgcgtc | atggtattca | gcagtctgca | 960 |
| ctagttaaat | tctttgtctg | caaatacgat | gatgactgtg | accactatgc | tggtaattt | 1020 |
| tacatccttg | gtgtatgaagc | tggaaatgcca | tggggctatg | atcgcttttta | caaataatgag | 1080 |
| atcactgagc | agctcaatgc | cctggatcta | cacatcgagg | atagattttt | catcagatac | 1140 |
| gaagcgtttgc | atcttcatgg | tacaagtctt | ggaagcaaca | tcttccccaa | accttctgtc | 1200 |
| atacatgacg | aaggggcag | | | | | 1219 |

<210> 10
<211> 1244
<212> DNA
<213> Hali

```

<400> 10
gtcaccatca ggctgacgag tacgacgaag ttgtaactgc tgcaagccac atcagaaaaga 60
atttaaaaga tctgtcaaag ggagaagtag agagcctaag gtctgccttc ctgcaacttc 120
agaacgacgg agtctatgag aatattgcca agttccacgg caagcctggg ttgtgtatg 180
ataacggtcg caagggtgcc tgggtgtcc atggaatgcc caccctcccc cagtggcaca 240
ggctctatgt cttccagggtg gagaatgctt tgctggagag aggtctgccc gtctctgtgc 300
catactggga ctggactgaa acatttacag agctgccatc tttgattgct gaggctac 360
atttcaattc cctgtcaacaa acgtttgacc ctaatcctt cttcagaggt aaaatcagtt 420
ttgagaatgc tggtaacaaca cgtgatcccc agcctgagct gtacgttaac aggtactact 480
acccaaaacgt catgttgggt tttgaacagg acaactactg cgacttcgag atacagttg 540
agatggttca caatgttctc catgcttggc ttgggtggaa agctacttat tctatttctt 600
ctcttgatta ttctgcattc gaccctgtgt ttttcccttca ccatgcgaac acagatagat 660
gtggggccat ctggcaggag ctgcaggggt acagaagaa gccatacaat gaagcggatt 720
gtgccattaa cctaattgcgc aaacctctac atcccttgcg caacagtgtat ctcaatcatg 780
atccctgtaaac cttaaaatac tcaaaaaccca ctgtatggctt tgactaccag aacaactttg 840
gataacaagta tgacaacacctt gagttcaatc atttcagtat tcccaggctt gaagaaatca 900
ttcgtttag acaacgtcaa gatcgtgtgt ttgcaggatt ctccttcac aacattggga 960
catccgcaac tgggtggatata ttctgtgtgt tcccttaccac cagcgggtgag caaaactgtg 1020
aaaacaaaagc cggAACATTt gcccgtactcg gaggagaaac agagatggcg tttcattttg 1080
acagactcta cagggttgac atcagtgaaa cactgaggga cctcggcata cagctggaca 1140
gccatgactt tgacctcagc atcaagattc aaggagtaaa tggatcctac cttgatccac 1200
acatccctqcc aqagccatcc ttgatTTTtgcctgggtc aagt 1244

```

```
<210> 11
<211> 1284
<212> DNA
<213> Haliothis tuberculata
```

```
<400> 11
tcttcctgc gtcctgatgg gcattcagat gacatccttg tgagaaaaaga agtgaacagc 60
ctgacaacca gggagactgc atctctgatc catgctctga aaagtatgca ggaagaccat 120
tcacacctqacq qgttccaaqc cattgcctct ttccatgctc tgccaccact ctgcccttca 180
```

ccatctgcag ctcaccgtta tgcttgctgt gtccacggca tggctacatt tccccagtg 240
 cacagattgt acactgtaca gttccaggat gcactgagga gacatggagc tacggtaggt 300
 gtaccgtatt gggattggct gcgaccgcag tctcacctac cagagcttgc caccatggag 360
 acataccatg atatttggag taacagagat ttccccaaatc ctttctacca agccaatatt 420
 gagtttgaag gagaaaacat tacaacagag agagaagtca ttgcagacaa acttttgc 480
 aaaggtggac acgttttga taaactggtt cttcaacaaa gccatcctag cgctgagcag 540
 gaaaactact gtgactttga gattcagttt gaaattcttc acaacggcgt tcacacgtgg 600
 gtcggaggca gtcgtaccta ctctatcgga catcttcatt acgcattcta cgacccttt 660
 ttctaccttc accatttca gacagaccgt atttggc 720
 cagagagggc tctcgggtga tgaggctcac tggctctcg agcaaatgag agaaccattg 780
 aagccttca gcttcggcgc tccttataac tggaaatcagc tcacacagga tttctcccga 840
 cccgaggaca ctttcgacta caggaagttt gtttatgaat atgacaattt agaattcctg 900
 ggaatgtca gttgctgaact ggatcaatac attattgaac atcaagaaaa tgatagagta 960
 ttcgctgggt tcctgttgag tggattcgg 1020
 agagctgatt ccacatgtca ggatgctggg tacttcaccg ttcttggc 1080
 atggcgtggg catttgacag gcttacaaa tatgacatta ctgaaactct ggagaaaaatg 1140
 cacccctcgat atgatgatga cttcacaatc tctgtcagtc tgaccgccaa caacggaaact 1200
 gtcctgagca gcagtcta atccaaacaccg agtgtcatat tccagcgggg acatcgac 1260
 ataaataccca ggagcatgtc accg 1284

<210> 12

<211> 1221

<212> DNA

<213> *Haliotis tuberculata*

<400> 12

aaccgtgttc gccgtgagct gagcgatctg tctgcgaggg acctgtctag tctcaagtct 60
 gctctgcgag acctacagga ggatgatggc cccaaacggat accaggctct tgca gcttc 120
 catgggctac cagcaggctg ccatgatagc cggggaaatg agatcgcatg ttgcattcac 180
 gggatgccga cttccccca gtggcacaga ctgtacaccc tgca gtttgc 240
 aggagacatg gatcatctgt cccatcccc tactggact ggacaaagcc tatctccgaa 300
 ctccccctcg tcttcaccag ccctgagttat tatgacccat ggcatgatgc tggtaaac 360
 aacccttcc ccaaagggtt tgcattt gcaaaatcc acacagtaag agacccacag 420
 gagatgctgt tccagcttg tgaacatgga gagtcaatcc tctatgagca aactcttctt 480
 gctcttgagc aaaccgacta ctgtgatttt gaggtacagt ttgaggctt ccataacgtg 540
 atccactacc ttgttggc 600
 tacgacccat tcttctt acaccattcc tttgtggata agatgtgggt agtatggc 660
 gctcttcaaa agaggaggaa acttccatac aagcgagctg actgtgctgt caacctaattg 720
 actaaaccaa tgaggccatt tgactccgat atgaatcaga acccattcac aaagatgc 780
 cagttccca acacactcta tgactacgag acactgtact acagctacga taatctcgaa 840
 ataggtggca ggaatctcg 900
 cgcgttttg ctggattctt gtttcgtgg 960
 attttagaa atgaaaatga ctgcccacagg ggtggataaa ttttcatctt aggtggagcc 1020
 aaggaaatgc catggtcatt tgacagaaaac ttcaagttt atatcaccctt tgcactcgag 1080
 aatgctggca ttagcccaga ggacgtgtt gatgctgagg agccattta tatcaagg 1140
 gagatccatg ctgttaacaa gaccatgata ccgtcgctg tgatcccagc cccaaactatc 1200
 atctattctc ctggggaaagg t 1221

<210> 13

<211> 1205

<212> DNA

<213> *Haliotis tuberculata*

<400> 13

cgcgtgtcg acagtgcaca ctggccaac attgctggct ctgggggtgag gaaggacg 60
 acgaccctta ctgtgtctga gaccgagaac ctaagacagg ctcttcaagg tgcactcgat 120
 gataccggc 180
 gagatgaacg gccgcaaggg tgcctgttgc gtcacggta tggctcttcccacactgg 240
 cacagactgt atgtgaagca gatggaagat gccctggctg accacggc 300

20.00.00
35

atcccttact gggactggac aactgccttc acagagttac ccgccttgc cacagactcc 360
gagaacaatc cttccatga gggtcgcatt gatcatctcg gtgttaaccac gtcacgttcc 420
cccaagagaca tgctgtttaa cgacccagag caaggatcg agtcgttctt ctatagacaa 480
gtccctctgg ctttggagca gactgactac tgccagttcg aagtccagtt tgagctgacc 540
cacaacgcca ttcactctg gacaggtgga cgtagccctt acggaatgtc gaccctcgag 600
ttcacagcct acgatcctt cttctggctt caccactcca acaccgacag aatctggct 660
gtctggcaag cactgcagaa ataccgagga ctcccataca acgaagcaca ctgtgaaatc 720
caggttctga aacagccctt gaggccattc aacgatgaca tcaaccacaa tccaatcacc 780
aagactaatg ccaggcctat cgattcattt gattatgaga ggttaacta tcagtatgac 840
acccttagct tccatggtaa gacatcccctt gaactgaatg acctgctcgaa gaaaagaaaa 900
agagaagaga gaacatttgc tgccttcctt cttcgtggaa tcggttgcag tgctgatgtc 960
gtcttgaca tctggccggcc caatggtgac tgcgttgcag tgctgtgctg 1020
ggagggggagc tagaaatgcc ttggcttc gacagactgt tccgctatga catcaccaga 1080
gtcatgaatc agctccatct ccagtatgat tcaatttca gtttcagggt gaagcttgtt 1140
gccaccaatg gcactgagct ttcatcagac cttctcaagt caccacaat tgaacatgaa 1200
cttgg 1205

<210> 14
<211> 1546
<212> DNA
<213> *Haliotis tuberculata*

<400> 14
agccccacaga ggaccagttg aagaaacaga agtcactcgc caacatactg acggcaatgc 60
acactttcat cgtaaggaag ttgattcgct gtccctggat gaagcaaaca acttgaagaa 120
tgcccttac aagctacaga acgaccacag tctaacggga tacgaagcaa tctctggta 180
ccatggatac cccaatctgt gtccggaaaga aggcgatgac aaaatacccc tgctgcgtcc 240
ccggatgggc atcttcctt actggcacag actcttgacc attcaactgg aaagagctct 300
tgagcacaat ggtgcactgc ttgggttcc ttactggac tggaacaagg acctgtcg 360
actgcccggcg ttcttctccg actccagcaa caacaatccc tacttcaagt accacatcgc 420
cggtgttggg cacgacacccg tcagagagcc aactagtctt atatataacc agccccaaat 480
ccatggttat gattatctt attaccttgc attgaccacg cttgaagaaa acaattactg 540
ggacttttag gttcagtatg agatcctcca caacggcgtc cactcctggc ttggaggatc 600
ccagaagttat tccatgtcta ccctggagta ttcggccctt gaccctgtct ttatgatcct 660
tcactcgggt ctagacagac ttggatcat ctggcaagaa cttcagaaga tcaggagaaa 720
gccctacaac ttgcataat gtgcttatca tatgtggaa gagccactgg cggcccttcag 780
ctatccatct atcaaccagg acgagttcac ccgtgccaac tccaaggctt ctacagttt 840
tgacagccat aagttcggct accattacga taacctgaat gtttagaggc acagcatcca 900
agaactcaac acaatcatca atgacttgag aaacacagac agaatctacg caggattgt 960
tttgtcaggc atcggtacgt ctgctagtgt caagatctat ctccgaacag atgacaatga 1020
cgaagaagtt ggaactttca ctgtcctggg aggagagagg gaaatgccc gggcctacga 1080
gcgagttttc aagtatgaca tcacagaggt tgcaagataga cttaaaaatta agttatgggg 1140
acacccttta acttccggaa ctggagatca catccttacg aatggaatcg gtggtaaaca 1200
agagcctacc caaatcctt catcatctac agacctgcca atcatgacta cgatgttctt 1260
gttataccag tanggaagaa accttcacat ccctcccaa gttgtcgta agaaaaggcac 1320
ccgcacatcgat ttccacccag tcgatgattc agttacgaga ccagttgttg atcttggaaag 1380
ctacactgca ctcttcaact gtgtggtacc accgttcaca taccacggat tcgaactgaa 1440
ccacgtctat tctgtcaagc ctggtgacta ctatgttact ggaccacga gagacccttg 1500
ccagaatgca gatgtcagga ttcatatcca tgttgaggat gagtaa 1546

<210> 15
<211> 633
<212> DNA
<213> *Megathura crenulata*

<400> 15
tggcatcgct tcgctacact gctttgatc cactattcta cttgcacatc tctaatacg 60
atcgatatacg ggcaatatgg caggcttac agaagtacag agaaaaaccg tacaacgttg 120
ctaactgtgc tgttacatcg atgagagaac ctttgcaccc tctgccaata 180

36.00.00

tcaacacaga ccatgttaacc aaggagcatt cagtgccatt caacgtttt gattacaaga 240
ccaatttcaa ttatgaatat gacacttgg aatttaacgg tctctcaatc tctcagttga 300
ataaaaagct cgaagcgata aagagccaag acaggttctt tgcaggcttc ctgttatctg 360
gtttcaagaa atcatctctt gttaaattca atatttgcac cgatagcagc aactgtcacc 420
ccgctggaga gtttacctt ctgggtgatg aaaacgagat gccatggca tacgatagag 480
tcttcaaata tgacataacc gaaaaactcc acgatctaaa gctgcatgca gaagaccact 540
tctacattga ctatgaagta tttgacctta aaccagcaag cctggggaaa gatttggta 600
agcagccttc agtcatcattcat gaaccaagaa tag 633

<210> 16

<211> 1236

<212> DNA

<213> Megathura crenulata

<400> 16

gtcaccatga aggcaagta tatcaagctg aagtaacttc tgccaaaccgt attcgaaaaaa 60
acattgaaaaa tctgagcctt ggtgaactcg aaagtctgag agctgccttc ctggaaattt 120
aaaacgatgg aacttacgaa tcaatagcta aattccatgg tagccctggg ttgtgccagt 180
taaatggtaa ccccatctct tgggtgtcc atggcatgcc aacttccct cactggcaca 240
gactgtacgt ggttgcgtt gagaatgccc tcctgaaaaa aggatcatct gtagctgttc 300
cctattggga ctggacaaaaa cgaatcgaac atttacctca cctgatttca gacgcccactt 360
actacaattc caggcaacat cactatgaga caaaccattt ccattatggc aaaatcacac 420
acgagaatga aatcactact agggatccca aggacagcctt cttccattca gactacttt 480
acgagcaggt ccttacgccc ttggagcagg ataacttctg tgatttcgag attcagttgg 540
agatattaca caatgcattt cattcttac ttggggccaa aggtttat tccatgtcaa 600
accttgatta cgctgctttt gatcctgtgt tcttccttca tcacgcaacg actgacagaa 660
tctgggcaat ctggcaagac cttcagaggt tccgaaaaacg gccataccga gaagcgaatt 720
gctgtatcca attgtatgcac acgcccactcc agccgtttga taagagcgc aacaatgacg 780
aggcaacgaa aacgcatttcc actccacatg atgggtttga atatcaaaac agctttgggt 840
atgcttacga taatctggaa ctgaatctact actcgatttcc tcagcttgc acatgtgc 900
aagaaagaaaa aaggcatgac agagtattcg ctggcttccctt cttccacaat attggaacat 960
ctgcccgtatgg ccattgttattt gtatgttcc caactggggaa acacacgaa gactgcagtc 1020
atgaggctgg tatgttctcc atcttaggcg gtcaaaacgaa gatgtcctt gtatgttgc 1080
gactttacaa acttgacata actaaaggct tggaaaaaaa cgggtgtgcac ctgcaagggg 1140
atttcgatct ggaaatttggg attacggctg tgaatggatc tcacatctgac agtcatgtca 1200
tccactctcc cactatactg tttgaggccg gaacag 1236

<210> 17

<211> 241

<212> DNA

<213> Megathura crenulata

<400> 17

attctgcca cacagatgat ggacacactg aaccagtgtt gattcgaaaa gatatacacac 60
aattggacaa gcgtcaacaa ctgtcaactgg tggaaaggccctt cgagtcattt aaagccgacc 120
attcatctga tgggttccag gcaatcgctt cttccatgc tcttccttcc tttgtccat 180
caccagctgc ttcaaagagg tttgcgtgtt gcttccatgg catgccaacc ttcccgaaat 240
9 241

<210> 18

<211> 623

<212> DNA

<213> Megathura crenulata

<400> 18

gcttcgttac actgcttttgc atcctatattt ttacctccat cactcaaattt tttgtatgtct 60
ctggggccatt tggcaagctc ttcaaatcg gagaggcaag tcttacaagg cccactgcgc 120
ctcgcttcaa gaaagagaac cattaaagcc ttttgcattt agttccccac tgaacaacaa 180
cgagaaaaacg taccacaactt ctgtccccac taacgtttat gactatgtgg gagtttgca 240

22.08.00
37

ctatcgatat gatgacacctc agtttggcgg tatgaccatg tcagaacttg aggaatata 300
tcacaaggcag acacaacatg atagaacctt tgcaggattc ttcccttcat atattggAAC 360
atcagcaagc gtagatatct tcatcaatcg agaaggcat gataaataca aagtggGAAG 420
ttttgttaga cttgggtggat ccaaagaaat gaaatggggc tttgatagaa tgtacaagta 480
tgagatcact gaggctctga agacgctgaa tggatcgatg gatgatgggt tcagcattac 540
tggttagatc accgatgttg atggatctcc cccatctgca gatctcattc cacctcctgc 600
tataatctt gaacgtggtc atg 623

<210> 19
<211> 314
<212> DNA
<213> Megathura crenulata

<400> 19
ctgatgccaa agactttggc catagcagaa aaatcaggaa agacgttgat tctctgacag 60
tcgaagaaca aacttcgttg aggcgagcta tggcagatct acaggacgac aaaacatcag 120
ggggtttcca gcagattgca gcattccacg gagaacccaa atggtgtcca agccccgaag 180
cggagaaaaaa atttgcatgc tgtgttcatg gaatggctgt tttccctcac tggcacagat 240
tgctgacagt tcaaggagaa aatgctctga ggaaacatgg ctttactggg ggactgcctt 300
actgggactg gaca 314

<210> 20
<211> 408
<212> PRT
<213> Haliotis tuberculata

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)...(408)
<223> HtH 1 Domäne b

<400> 20
Asp His Leu Thr Arg Glu Glu Glu Tyr Glu Leu Arg Met Ala Leu Glu
1 5 10 15

Arg Phe Gln Ala Asp Thr Ser Val Asp Gly Tyr Gln Ala Thr Val Glu
20 25 30

Tyr His Gly Leu Pro Ala Arg Cys Pro Arg Pro Asp Ala Lys Val Arg
35 40 45

Phe Ala Cys Cys Met His Gly Met Ala Ser Phe Pro His Trp His Arg
50 55 60

Leu Phe Val Thr Gln Val Glu Asp Ala Leu Val Arg Arg Gly Ser Pro
65 70 75 80

Ile Gly Val Pro Tyr Trp Asp Trp Thr Lys Pro Met Thr His Leu Pro
85 90 95

Asp Leu Ala Ser Asn Glu Thr Tyr Val Asp Pro Tyr Gly His Thr His
100 105 110

His Asn Pro Phe Phe Asn Ala Asn Ile Ser Phe Glu Glu Gly His His
115 120 125

His Thr Ser Arg Met Ile Asp Ser Lys Leu Phe Ala Pro Val Ala Phe
130 135 140

38

Gly Glu His Ser His Leu Phe Asp Gly Ile Leu Tyr Ala Phe Glu Gln
145 150 155 160

Glu Asp Phe Cys Asp Phe Glu Ile Gln Phe Glu Leu Val His Asn Ser
165 170 175

Ile His Ala Trp Ile Gly Gly Ser Glu Asp Tyr Ser Met Ala Thr Leu
180 185 190

His Tyr Thr Ala Phe Asp Pro Ile Phe Tyr Leu His His Ser Asn Val
195 200 205

Asp Arg Leu Trp Ala Ile Trp Gln Ala Leu Gln Ile Arg Arg His Lys
210 215 220

Pro Tyr Gln Ala His Cys Ala Gln Ser Val Glu Gln Leu Pro Met Lys
225 230 235 240

Pro Phe Ala Phe Pro Ser Pro Leu Asn Asn Asn Glu Lys Thr His Ser
245 250 255

His Ser Val Pro Thr Asp Ile Tyr Asp Tyr Glu Glu Val Leu His Tyr
260 265 270

Ser Tyr Asp Asp Leu Thr Phe Gly Gly Met Asn Leu Glu Glu Ile Glu
275 280 285

Glu Ala Ile His Leu Arg Gln Gln His Glu Arg Val Phe Ala Gly Phe
290 295 300

Leu Leu Ala Gly Ile Gly Thr Ser Ala Leu Val Asp Ile Phe Ile Asn
305 310 315 320

Lys Pro Gly Thr Gln Pro Leu Lys Ala Gly Asp Ile Ala Ile Leu Gly
325 330 335

Gly Ala Lys Glu Met Pro Trp Ala Phe Asp Arg Leu Tyr Lys Val Glu
340 345 350

Ile Thr Asp Ser Leu Lys Thr Leu Ser Leu Asp Val Asp Gly Asp Tyr
355 360 365

Glu Val Thr Phe Lys Ile His Asp Met His Gly Asn Ala Leu Asp Thr
370 375 380

Asp Leu Ile Pro His Ala Ala Val Val Ser Glu Pro Ala His Pro Thr
385 390 395 400

Phe Glu Asp Glu Lys His Ser Leu
405

<210> 21
<211> 404
<212> PRT
<213> Haliotis tuberculata

<220>

22.00.00

39

<221> DOMAIN

<222> (1)..(404)

<223> HtH 1 Domäne c

<400> 21

Arg Ile Arg Lys Asn Val Asp Ser Leu Thr Pro Glu Glu Thr Asn Glu
1 5 10 15

Leu Arg Lys Ala Leu Glu Leu Leu Glu Asn Asp His Thr Val Gly Gly
20 25 30

Phe Asn Gln Leu Gly Ala Phe His Gly Glu Pro Lys Trp Cys Pro Asn
35 40 45

Pro Glu Ala Glu His Lys Val Ala Cys Cys Val His Gly Met Ala Val
50 55 60

Phe Pro His Trp His Arg Leu Leu Ala Leu Gln Ala Glu Asn Ala Leu
65 70 75 80

Arg Lys His Gly Tyr Ser Gly Ala Leu Pro Tyr Trp Asp Trp Thr Arg
85 90 95

Pro Leu Ser Gln Leu Pro Asp Leu Val Ser His Glu Gln Tyr Thr Asp
100 105 110

Pro Ser Asp His His Val Lys His Asn Pro Trp Phe Asn Gly His Ile
115 120 125

Asp Thr Val Asn Gln Asp Thr Thr Arg Ser Val Arg Glu Asp Leu Tyr
130 135 140

Gln Gln Pro Glu Phe Gly His Phe Thr Asp Ile Ala Gln Gln Val Leu
145 150 155 160

Leu Ala Leu Glu Gln Asp Asp Phe Cys Ser Phe Glu Val Gln Tyr Glu
165 170 175

Ile Ser His Asn Phe Ile His Ala Leu Val Gly Gly Thr Asp Ala Tyr
180 185 190

Gly Met Ala Ser Leu Arg Tyr Thr Ala Tyr Asp Pro Ile Phe Phe Leu
195 200 205

His His Ser Asn Thr Asp Arg Ile Trp Ala Ile Trp Gln Ser Leu Gln
210 215 220

Lys Tyr Arg Gly Lys Pro Tyr Asn Thr Ala Asn Cys Ala Ile Glu Ser
225 230 235 240

Met Arg Arg Pro Leu Gln Pro Phe Gly Leu Ser Ser Ala Ile Asn Pro
245 250 255

Asp Arg Ile Thr Arg Glu His Ala Ile Pro Phe Asp Val Phe Asn Tyr
260 265 270

Arg Asp Asn Leu His Tyr Val Tyr Asp Thr Leu Glu Phe Asn Gly Leu
275 280 285

22.03.01
40

Ser Ile Ser Gln Leu Asp Arg Glu Leu Glu Lys Ile Lys Ser His Glu
290 295 300

Arg Val Phe Ala Gly Phe Leu Leu Ser Gly Ile Lys Lys Ser Ala Leu
305 310 315 320

Val Lys Phe Glu Val Cys Thr Pro Pro Asp Asn Cys His Lys Ala Gly
325 330 335

Glu Phe Tyr Leu Leu Gly Asp Glu Asn Glu Met Ala Trp Ala Tyr Asp
340 345 350

Arg Leu Phe Lys Tyr Asp Ile Thr Gln Val Leu Glu Ala Asn His Leu
355 360 365

His Phe Tyr Asp His Leu Phe Ile Arg Tyr Glu Val Phe Asp Leu Lys
370 375 380

Gly Val Ser Leu Gly Thr Asp Leu Phe His Thr Ala Asn Val Val His
385 390 395 400

Asp Ser Gly Thr

<210> 22
<211> 413
<212> PRT
<213> *Haliotis tuberculata*

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(413)
<223> HtH 1 Domäne d

<400> 22
Gly Thr Arg Asp Arg Asp Asn Tyr Val Glu Glu Val Thr Gly Ala Ser
1 5 10 15

His Ile Arg Lys Asn Leu Asn Asp Leu Asn Thr Gly Glu Met Glu Ser
20 25 30

Leu Arg Ala Ala Phe Leu His Ile Gln Asp Asp Gly Thr Tyr Glu Ser
35 40 45

Ile Ala Gln Tyr His Gly Lys Pro Gly Lys Cys Gln Leu Asn Asp His
50 55 60

Asn Ile Ala Cys Cys Val His Gly Met Pro Thr Phe Pro Gln Trp His
65 70 75 80

Arg Leu Tyr Val Val Gln Val Glu Asn Ala Leu Leu Asn Arg Gly Ser
85 90 95

Gly Val Ala Val Pro Tyr Trp Glu Trp Thr Ala Pro Ile Asp His Leu
100 105 110

Pro His Phe Ile Asp Asp Ala Thr Tyr Phe Asn Ser Arg Gln Gln Arg
115 120 125

22.00 41

Tyr Asp Pro Asn Pro Phe Phe Arg Gly Lys Val Thr Phe Glu Asn Ala
130 135 140

Val Thr Thr Arg Asp Pro Gln Ala Gly Leu Phe Asn Ser Asp Tyr Met
145 150 155 160

Tyr Glu Asn Val Leu Leu Ala Leu Glu Gln Glu Asn Tyr Cys Asp Phe
165 170 175

Glu Ile Gln Phe Glu Leu Val His Asn Ala Leu His Ser Met Leu Gly
180 185 190

Gly Lys Gly Gln Tyr Ser Met Ser Ser Leu Asp Tyr Ser Ala Phe Asp
195 200 205

Pro Val Phe Phe Leu His His Ala Asn Thr Asp Arg Leu Trp Ala Ile
210 215 220

Trp Gln Glu Leu Gln Arg Phe Arg Glu Leu Pro Tyr Glu Glu Ala Asn
225 230 235 240

Cys Ala Ile Asn Leu Met His Gln Pro Leu Lys Pro Phe Ser Asp Pro
245 250 255

His Glu Asn His Asp Asn Val Thr Leu Lys Tyr Ser Lys Pro Gln Asp
260 265 270

Gly Phe Asp Tyr Gln Asn His Phe Gly Tyr Lys Tyr Asp Asn Leu Glu
275 280 285

Phe His His Leu Ser Ile Pro Ser Leu Asp Ala Thr Leu Lys Gln Arg
290 295 300

Arg His His Asp Arg Val Phe Ala Gly Phe Leu Leu His Asn Ile Gly
305 310 315 320

Thr Ser Ala Asp Ile Thr Ile Tyr Ile Cys Leu Pro Asp Gly Arg Arg
325 330 335

ly Asn Asp Cys Ser His Glu Ala Gly Thr Phe Tyr Ile Leu Gly Gly
340 345 350

Glu Thr Glu Met Pro Phe Ile Phe Asp Arg Leu Tyr Lys Phe Glu Ile
355 360 365

Thr Lys Pro Leu Gln Gln Leu Gly Val Lys Leu His Gly Gly Val Phe
370 375 380

Glu Leu Glu Leu Glu Ile Lys Ala Tyr Asn Gly Ser Tyr Leu Asp Pro
385 390 395 400

His Thr Phe Asp Pro Thr Ile Ile Phe Glu Pro Gly Thr
405 410

<210> 23
<211> 420
<212> PRT

22.03.06

42

<213> *Haliotis tuberculata*

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(420)

<223> HtH 1 Domäne e

<400> 23

Asp Thr His Ile Leu Asp His Asp His Glu Glu Glu Ile Leu Val Arg
1 5 10 15

Lys Asn Ile Ile Asp Leu Ser Pro Arg Glu Arg Val Ser Leu Val Lys
20 25 30

Ala Leu Gln Arg Met Lys Asn Asp Arg Ser Ala Asp Gly Tyr Gln Ala
35 40 45

Ile Ala Ser Phe His Ala Leu Pro Pro Leu Cys Pro Asn Pro Ser Ala
50 55 60

Ala His Arg Tyr Ala Cys Cys Val His Gly Met Ala Thr Phe Pro Gln
65 70 75 80

Trp His Arg Leu Tyr Thr Val Gln Val Gln Asp Ala Leu Arg Arg His
85 90 95

Gly Ser Leu Val Gly Ile Pro Tyr Trp Asp Trp Thr Lys Pro Val Asn
100 105 110

Glu Leu Pro Glu Leu Leu Ser Ser Ala Thr Phe Tyr His Pro Ile Arg
115 120 125

Asn Ile Asn Ile Ser Asn Pro Phe Leu Gly Ala Asp Ile Glu Phe Glu
130 135 140

Gly Pro Gly Val His Thr Glu Arg His Ile Asn Thr Glu Arg Leu Phe
145 150 155 160

His Ser Gly Asp His Asp Gly Tyr His Asn Trp Phe Phe Glu Thr Val
165 170 175

Leu Phe Ala Leu Glu Gln Glu Asp Tyr Cys Asp Phe Glu Ile Gln Phe
180 185 190

Glu Ile Ala His Asn Gly Ile His Thr Trp Ile Gly Gly Ser Ala Val
195 200 205

His Gly Met Gly His Leu His Tyr Ala Ser Tyr Asp Pro Ile Phe Tyr
210 215 220

Ile His His Ser Gln Thr Asp Arg Ile Trp Ala Ile Trp Gln Glu Leu
225 230 235 240

Gln Lys Tyr Arg Gly Leu Ser Gly Ser Glu Ala Asn Cys Ala Ile Glu
245 250 255

His Met Arg Thr Pro Leu Lys Pro Phe Ser Phe Gly Pro Pro Tyr Asn
260 265 270

22.03.00
43

Leu Asn Ser His Thr Gin Glu Tyr Ser Lys Pro Glu Asp Thr Phe Asp
275 280 285

Tyr Lys Lys Phe Gly Tyr Arg Tyr Asp Ser Leu Glu Leu Glu Gly Arg
290 295 300

Ser Ile Ser Arg Ile Asp Glu Leu Ile Gln Gln Arg Gln Glu Lys Asp
305 310 315 320

Arg Thr Phe Ala Gly Phe Leu Leu Lys Gly Phe Gly Thr Ser Ala Ser
325 330 335

Val Ser Leu Gln Val Cys Arg Val Asp His Thr Cys Lys Asp Ala Gly
340 345 350

Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Gly Ser Ala Glu Met Pro Trp Ala Phe Asp
355 360 365

Arg Leu Tyr Lys Tyr Asp Ile Thr Lys Thr Leu His Asp Met Asn Leu
370 375 380

Arg His Glu Asp Thr Phe Ser Ile Asp Val Thr Ile Thr Ser Tyr Asn
385 390 395 400

Gly Thr Val Leu Ser Gly Asp Leu Ile Gln Thr Pro Ser Ile Ile Phe
405 410 415

Val Pro Gly Arg
420

<210> 24

<211> 417

<212> PRT

<213> *Haliothis tuberculata*

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(417)

<223> HTH 1 Domäne f

<400> 24

His Lys Leu Asn Ser Arg Lys His Thr Pro Asn Arg Val Arg His Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Ser Ser Arg Asp Ile Ala Ser Leu Lys Ala Ala Leu
20 25 30

Thr Ser Leu Gln His Asp Asn Gly Thr Asp Gly Tyr Gln Ala Ile Ala
35 40 45

Ala Phe His Gly Val Pro Ala Gln Cys His Glu Pro Ser Gly Arg Glu
50 55 60

Ile Ala Cys Cys Ile His Gly Met Ala Thr Phe Pro His Trp His Arg
65 70 75 80

Leu Tyr Thr Leu Gln Leu Glu Gln Ala Leu Arg Arg His Gly Ser Ser
85 90 95

32.03.01
44

Val Ala Val Pro Tyr Trp Asp Trp Thr Lys Pro Ile Thr Glu Leu Pro
100 105 110

His Ile Leu Thr Asp Gly Glu Tyr Tyr Asp Val Trp Gln Asn Ala Val
115 120 125

Leu Ala Asn Pro Phe Ala Arg Gly Tyr Val Lys Ile Lys Asp Ala Phe
130 135 140

Thr Val Arg Asn Val Gln Glu Ser Leu Phe Lys Met Ser Ser Phe Gly
145 150 155 160

Lys His Ser Leu Leu Phe Asp Gln Ala Leu Leu Ala Leu Glu Gln Thr
165 170 175

Asp Tyr Cys Asp Phe Glu Val Gln Phe Glu Val Met His Asn Thr Ile
180 185 190

His Tyr Leu Val Gly Gly Arg Gln Thr Tyr Ala Phe Ser Ser Leu Glu
195 200 205

Tyr Ser Ser Tyr Asp Pro Ile Phe Phe Ile His His Ser Phe Val Asp
210 215 220

Lys Ile Trp Ala Val Trp Gln Glu Leu Gln Ser Arg Arg His Leu Gln
225 230 235 240

Phe Arg Thr Ala Asp Cys Ala Val Gly Leu Met Gly Gln Ala Met Arg
245 250 255

Pro Phe Asn Lys Asp Phe Asn His Asn Ser Phe Thr Lys Lys His Ala
260 265 270

Val Pro Asn Thr Val Phe Asp Tyr Glu Asp Leu Gly Tyr Asn Tyr Asp
275 280 285

Asn Leu Glu Ile Ser Gly Leu Asn Leu Asn Glu Ile Glu Ala Leu Ile
290 295 300

Ala Lys Arg Lys Ser His Ala Arg Val Phe Ala Gly Phe Leu Leu Phe
305 310 315 320

Gly Leu Gly Thr Ser Ala Asp Ile His Leu Glu Ile Cys Lys Thr Ser
325 330 335

Glu Asn Cys His Asp Ala Gly Val Ile Phe Ile Leu Gly Gly Ser Ala
340 345 350

Glu Met His Trp Ala Tyr Asn Arg Leu Tyr Lys Tyr Asp Ile Thr Glu
355 360 365

Ala Leu Gln Glu Phe Asp Ile Asn Pro Glu Asp Val Phe His Ala Asp
370 375 380

Glu Pro Phe Phe Leu Arg Leu Ser Val Val Ala Val Asn Gly Thr Val
385 390 395 400

Ile Pro Ser Ser His Leu His Gln Pro Thr Ile Ile Tyr Glu Pro Gly

22.03.00

405

410

415

Glu

<210> 25
<211> 403
<212> PRT
<213> *Haliotis tuberculata*

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(403)
<223> HtH 1 Domäne g

<400> 25
Asp His His Asp Asp His Gln Ser Gly Ser Ile Ala Gly Ser Gly Val
1 5 10 15

Arg Lys Asp Val Asn Thr Leu Thr Lys Ala Glu Thr Asp Asn Leu Arg
20 25 30

Glu Ala Leu Trp Gly Val Met Ala Asp His Gly Pro Asn Gly Phe Gln
35 40 45

Ala Ile Ala Ala Phe His Gly Lys Pro Ala Leu Cys Pro Met Pro Asp
50 55 60

Gly His Asn Tyr Ser Cys Cys Thr His Gly Met Ala Thr Phe Pro His
65 70 75 80

Trp His Arg Leu Tyr Thr Lys Gln Met Glu Asp Ala Met Arg Ala His
85 90 95

Gly Ser His Val Gly Leu Pro Tyr Trp Asp Trp Thr Ala Ala Phe Thr
100 105 110

His Leu Pro Thr Leu Val Thr Asp Thr Asp Asn Asn Pro Phe Gln His
115 120 125

Gly His Ile Asp Tyr Leu Asn Val Ser Thr Thr Arg Ser Pro Arg Asp
130 135 140

Met Leu Phe Asn Asp Pro Glu His Gly Ser Glu Ser Phe Phe Tyr Arg
145 150 155 160

Gln Val Leu Leu Ala Leu Glu Gln Thr Asp Phe Cys Lys Phe Glu Val
165 170 175

Gln Phe Glu Ile Thr His Asn Ala Ile His Ser Trp Thr Gly Gly His
180 185 190

Ser Pro Tyr Gly Met Ser Thr Leu Asp Phe Thr Ala Tyr Asp Pro Leu
195 200 205

Phe Trp Leu His His Ser Asn Thr Asp Arg Ile Trp Ala Val Trp Gln
210 215 220

22.03.00

Ala Leu Gln Glu Tyr Arg Gly Leu Pro Tyr Asn His Ala Asn Cys Glu
225 230 235 240

Ile Gln Ala Met Lys Thr Pro Leu Arg Pro Phe Ser Asp Asp Ile Asn
245 250 255

His Asn Pro Val Thr Lys Ala Asn Ala Lys Pro Leu Asp Val Phe Glu
260 265 270

Tyr Asn Arg Leu Ser Phe Gln Tyr Asp Asn Leu Ile Phe His Gly Tyr
275 280 285

Ser Ile Pro Glu Leu Asp Arg Val Leu Glu Glu Arg Lys Glu Glu Asp
290 295 300

Arg Ile Phe Ala Ala Phe Leu Leu Ser Gly Ile Lys Arg Ser Ala Asp
305 310 315 320

Val Val Phe Asp Ile Cys Gln Pro Gly His Glu Cys Val Phe Ala Gly
325 330 335

Thr Phe Ala Ile Leu Gly Gly Glu Leu Glu Met Pro Trp Ser Phe Asp
340 345 350

Arg Leu Phe Arg Tyr Asp Ile Thr Lys Val Met Lys Gln Leu His Leu
355 360 365

Arg His Asp Ser Asp Phe Thr Phe Arg Val Lys Ile Val Gly Thr Asp
370 375 380

Asp His Glu Leu Pro Ser Asp Ser Val Lys Ala Pro Thr Ile Glu Phe
385 390 395 400

Glu Pro Gly

<210> 26
<211> 511
<212> PRT
<213> Haliotis tuberculata

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(511)
<223> HtH 1 Domäne h

<400> 26
Val His Arg Gly Gly Lys His Glu Asp Glu His His Asp Asp Arg Leu
1 5 10 15

Ala Asp Val Leu Ile Arg Lys Glu Val Asp Phe Leu Ser Leu Gln Glu
20 25 30

Ala Asn Ala Ile Lys Asp Ala Leu Tyr Lys Leu Gln Asn Asp Asp Ser
35 40 45

Lys Gly Gly Phe Glu Ala Ile Ala Gly Tyr His Gly Tyr Pro Asn Met
50 55 60

22.000.00
47.

Cys Pro Glu Arg Gly Thr Asp Lys Tyr Pro Cys Cys Val His Gly Met
65 70 75 80

Pro Val Phe Pro His Trp His Arg Leu His Thr Ile Gln Met Glu Arg
85 90 95

Ala Leu Lys Asn His Gly Ser Pro Met Gly Ile Pro Tyr Trp Asp Trp
100 105 110

Thr Lys Lys Met Ser Ser Leu Pro Ser Phe Phe Gly Asp Ser Ser Asn
115 120 125

Asn Asn Pro Phe Tyr Lys Tyr Tyr Ile Arg Gly Val Gln His Glu Thr
130 135 140

Thr Arg Asp Val Asn Gln Arg Leu Phe Asn Gln Thr Lys Phe Gly Glu
145 150 155 160

Phe Asp Tyr Leu Tyr Tyr Leu Thr Leu Gln Val Leu Glu Glu Asn Ser
165 170 175

Tyr Cys Asp Phe Glu Val Gln Tyr Glu Ile Leu His Asn Ala Val His
180 185 190

Ser Trp Leu Gly Gly Thr Gly Gln Tyr Ser Met Ser Thr Leu Glu Tyr
195 200 205

Ser Ala Phe Asp Pro Val Phe Met Ile His His Ser Ser Leu Asp Arg
210 215 220

Ile Trp Ile Leu Trp Gln Lys Leu Gln Lys Ile Arg Met Lys Pro Tyr
225 230 235 240

Tyr Ala Leu Asp Cys Ala Gly Asp Arg Leu Met Lys Asp Pro Leu His
245 250 255

Pro Phe Asn Tyr Glu Thr Val Asn Glu Asp Glu Phe Thr Arg Ile Asn
260 265 270

Ser Phe Pro Ser Ile Leu Phe Asp His Tyr Arg Phe Asn Tyr Glu Tyr
275 280 285

Asp Asn Met Arg Ile Arg Gly Gln Asp Ile His Glu Leu Glu Val
290 295 300

Ile Gln Glu Leu Arg Asn Lys Asp Arg Ile Phe Ala Gly Phe Val Leu
305 310 315 320

Ser Gly Leu Arg Ile Ser Ala Thr Val Lys Val Phe Ile His Ser Lys
325 330 335

Asn Asp Thr Ser His Glu Glu Tyr Ala Gly Glu Phe Ala Val Leu Gly
340 345 350

Gly Glu Lys Glu Met Pro Trp Ala Tyr Glu Arg Met Leu Lys Leu Asp
355 360 365

Ile Ser Asp Ala Val His Lys Leu His Val Lys Asp Glu Asp Ile Arg

22.03.00

370 375 380

Phe Arg Val Val Val Thr Ala Tyr Asn Gly Asp Val Val Thr Thr Arg
385 390 395 400

Leu Ser Gln Pro Phe Ile Val His Arg Pro Ala His Val Ala His Asp
405 410 415

Ile Leu Val Ile Pro Val Gly Ala Gly His Asp Leu Pro Pro Lys Val
420 425 430

Val Val Lys Ser Gly Thr Lys Val Glu Phe Thr Pro Ile Asp Ser Ser
435 440 445

Val Asn Lys Ala Met Val Glu Leu Gly Ser Tyr Thr Ala Met Ala Lys
450 455 460

Cys Ile Val Pro Pro Phe Ser Tyr His Gly Phe Glu Leu Asp Lys Val
465 470 475 480

Tyr Ser Val Asp His Gly Asp Tyr Tyr Ile Ala Ala Gly Thr His Ala
485 490 495

Leu Cys Glu Gln Asn Leu Arg Leu His Ile His Val Glu His Glu
500 505 510

<210> 27

<211> 104

<212> PRT

<213> *Haliotis tuberculata*

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(104)

<223> Partielle HtH 2 Domäne h

<400> 27

Phe Phe Leu Ser His Ile Gly Thr Ser Ala Asn Val Glu Ile Ile Ile
1 5 10 15

Asp His Gly Thr Leu His Thr Ser Val Gly Thr Phe Ala Val Leu Gly
20 25 30

Gly Glu Lys Glu Met Lys Trp Gly Phe Asp Arg Leu Tyr Lys Tyr Glu
35 40 45

Ile Thr Asp Glu Leu Arg Gln Leu Asn Leu Arg Ala Asp Asp Val Phe
50 55 60

Ser Ile Ser Val Lys Val Thr Asp Val Asp Gly Ser Glu Leu Ser Ser
65 70 75 80

Glu Leu Ile Pro Ser Ala Ala Ile Ile Phe Glu Arg Ser His Ile Asp
85 90 95

His Gln Asp Pro His His Asp Thr
100

22.03.00
49.

<210> 28
<211> 408
<212> PRT
<213> Haliotis tuberculata

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(408)
<223> HtH 2 Domäne c

<400> 28
Ile Ile Arg Lys Asn Val Asp Asn Leu Thr Pro Glu Glu Ile Asn Ser
1 5 10 15

Leu Arg Arg Ala Met Ala Asp Leu Gln Ser Asp Lys Thr Ala Gly Gly
20 25 30

Phe Gln Gln Ile Ala Ala Phe His Gly Glu Pro Lys Trp Cys Pro Ser
35 40 45

Pro Asp Ala Glu Lys Lys Phe Ser Cys Cys Val His Gly Met Ala Val
50 55 60

Phe Pro His Trp His Arg Leu Leu Thr Val Gln Gly Glu Asn Ala Leu
65 70 75 80

Arg Lys His Gly Cys Leu Gly Ala Leu Pro Tyr Trp Asp Trp Thr Arg
85 90 95

Pro Leu Ser His Leu Pro Asp Leu Val Leu Val Ser Ser Arg Thr Thr
100 105 110

Pro Met Pro Tyr Ser Thr Val Glu Ala Arg Asn Pro Trp Tyr Ser Gly
115 120 125

His Ile Asp Thr Val Gly Val Asp Thr Thr Arg Ser Val Arg Gln Glu
130 135 140

Leu Tyr Glu Ala Pro Gly Phe Gly His Tyr Thr Gly Val Ala Lys Gln
145 150 155 160

Val Leu Leu Ala Leu Glu Gln Asp Asp Phe Cys Asp Phe Glu Val Gln
165 170 175

Phe Glu Ile Ala His Asn Phe Ile His Ala Leu Val Gly Gly Ser Glu
180 185 190

Pro Tyr Gly Met Ala Ser Leu Arg Tyr Thr Thr Tyr Asp Pro Ile Phe
195 200 205

Tyr Leu His His Ser Asn Thr Asp Arg Leu Trp Ala Ile Trp Gln Ala
210 215 220

Leu Gln Lys Tyr Arg Gly Lys Pro Tyr Asn Ser Ala Asn Cys Ala Ile
225 230 235 240

Ala Ser Met Arg Lys Pro Leu Gln Pro Phe Gly Leu Thr Asp Glu Ile
245 250 255

22.03.00

Asn Pro Asp Asp Glu Thr Arg Gln His Ala Val Pro Phe Ser Val Phe
260 265 270

Asp Tyr Lys Asn Asn Phe Asn Tyr Glu Tyr Asp Thr Leu Asp Phe Asn
275 280 285

Gly Leu Ser Ile Ser Gln Leu Asp Arg Glu Leu Ser Arg Arg Lys Ser
290 295 300

His Asp Arg Val Phe Ala Gly Phe Leu Leu His Gly Ile Gln Gln Ser
305 310 315 320

Ala Leu Val Lys Phe Phe Val Cys Lys Ser Asp Asp Asp Cys Asp His
325 330 335

Tyr Ala Gly Glu Phe Tyr Ile Leu Gly Asp Glu Ala Glu Met Pro Trp
340 345 350

Gly Tyr Asp Arg Leu Tyr Lys Tyr Glu Ile Thr Glu Gln Leu Asn Ala
355 360 365

Leu Asp Leu His Ile Gly Asp Arg Phe Phe Ile Arg Tyr Glu Ala Phe
370 375 380

Asp Leu His Gly Thr Ser Leu Gly Ser Asn Ile Phe Pro Lys Pro Ser
385 390 395 400

Val Ile His Asp Glu Gly Ala Gly
405

<210> 29

<211> 421

<212> PRT

<213> *Halictis tuberculata*

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(421)

<223> HtH 2 Domäne d

<400> 29

His His Gln Ala Asp Glu Tyr Asp Glu Val Val Thr Ala Ala Ser His
1 5 10 15

Ile Arg Lys Asn Leu Lys Asp Leu Ser Lys Gly Glu Val Glu Ser Leu
20 25 30

Arg Ser Ala Phe Leu Gln Leu Gln Asn Asp Gly Val Tyr Glu Asn Ile
35 40 45

Ala Lys Phe His Gly Lys Pro Gly Leu Cys Asp Asp Asn Gly Arg Lys
50 55 60

Val Ala Cys Cys Val His Gly Met Pro Thr Phe Pro Gln Trp His Arg
65 70 75 80

Leu Tyr Val Leu Gln Val Glu Asn Ala Leu Leu Glu Arg Gly Ser Ala

32.00.00

85

90

95

Val Ser Val Pro Tyr Trp Asp Trp Thr Glu Thr Phe Thr Glu Leu Pro
100 105 110

Ser Leu Ile Ala Glu Ala Thr Tyr Phe Asn Ser Arg Gln Gln Thr Phe
115 120 125

Asp Pro Asn Pro Phe Phe Arg Gly Lys Ile Ser Phe Glu Asn Ala Val
130 135 140

Thr Thr Arg Asp Pro Gln Pro Glu Leu Tyr Val Asn Arg Tyr Tyr Tyr
145 150 155 160

Gln Asn Val Met Leu Val Phe Glu Gln Asp Asn Tyr Cys Asp Phe Glu
165 170 175

Ile Gln Phe Glu Met Val His Asn Val Leu His Ala Trp Leu Gly Gly
180 185 190

Arg Ala Thr Tyr Ser Ile Ser Ser Leu Asp Tyr Ser Ala Phe Asp Pro
195 200 205

Val Phe Phe Leu His His Ala Asn Thr Asp Arg Leu Trp Ala Ile Trp
210 215 220

Gln Glu Leu Gln Arg Tyr Arg Lys Lys Pro Tyr Asn Glu Ala Asp Cys
225 230 235 240

Ala Ile Asn Leu Met Arg Lys Pro Leu His Pro Phe Asp Asn Ser Asp
245 250 255

Leu Asn His Asp Pro Val Thr Phe Lys Tyr Ser Lys Pro Thr Asp Gly
260 265 270

Phe Asp Tyr Gln Asn Asn Phe Gly Tyr Lys Tyr Asp Asn Leu Glu Phe
275 280 285

Asn His Phe Ser Ile Pro Arg Leu Glu Glu Ile Ile Arg Ile Arg Gln
290 295 300

Arg Gln Asp Arg Val Phe Ala Gly Phe Leu Leu His Asn Ile Gly Thr
305 310 315 320

Ser Ala Thr Val Glu Ile Phe Val Cys Val Pro Thr Thr Ser Gly Glu
325 330 335

Gln Asn Cys Glu Asn Lys Ala Gly Thr Phe Ala Val Leu Gly Gly Glu
340 345 350

Thr Glu Met Ala Phe His Phe Asp Arg Leu Tyr Arg Phe Asp Ile Ser
355 360 365

Glu Thr Leu Arg Asp Leu Gly Ile Gln Leu Asp Ser His Asp Phe Asp
370 375 380

Leu Ser Ile Lys Ile Gln Gly Val Asn Gly Ser Tyr Leu Asp Pro His
385 390 395 400

Ile Leu Pro Glu Pro Ser Leu Ile Phe Val Pro Gly Ser Ser Ser Phe
 405 410 415

Leu Arg Pro Asp Gly
 420

<210> 30
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> *Haliotis tuberculata*

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (1)..(410)
 <223> HtH 2 Domäne e

<400> 30
 His Ser Asp Asp Ile Leu Val Arg Lys Glu Val Asn Ser Leu Thr Thr
 1 5 10 15

Arg Glu Thr Ala Ser Leu Ile His Ala Leu Lys Ser Met Gln Glu Asp
 20 25 30

His Ser Pro Asp Gly Phe Gln Ala Ile Ala Ser Phe His Ala Leu Pro
 35 40 45

Pro Leu Cys Pro Ser Pro Ser Ala Ala His Arg Tyr Ala Cys Cys Val
 50 55 60

His Gly Met Ala Thr Phe Pro Gln Trp His Arg Leu Tyr Thr Val Gln
 65 70 75 80

Phe Gln Asp Ala Leu Arg Arg His Gly Ala Thr Val Gly Val Pro Tyr
 85 90 95

Trp Asp Trp Leu Arg Pro Gln Ser His Leu Pro Glu Leu Val Thr Met
 100 105 110

Leu Thr Tyr His Asp Ile Trp Ser Asn Arg Asp Phe Pro Asn Pro Phe
 115 120 125

Tyr Gln Ala Asn Ile Glu Phe Glu Gly Glu Asn Ile Thr Thr Glu Arg
 130 135 140

Glu Val Ile Ala Asp Lys Leu Phe Val Lys Gly Gly His Val Phe Asp
 145 150 155 160

Asn Trp Phe Phe Lys Gln Ala Ile Leu Ala Leu Glu Gln Glu Asn Tyr
 165 170 175

Cys Asp Phe Glu Ile Gln Phe Glu Ile Leu His Asn Gly Val His Thr
 180 185 190

Trp Val Gly Gly Ser Arg Thr Tyr Ser Ile Gly His Leu His Tyr Ala
 195 200 205

Phe Tyr Asp Pro Leu Phe Tyr Leu His His Ser Gln Thr Asp Arg Ile
 210 215 220

22.03.00

Trp Ala Ile Trp Gln Glu Leu Gln Glu Gln Arg Gly Leu Ser Gly Asp
225 230 235 240

Glu Ala His Cys Ala Leu Glu Gln Met Arg Glu Pro Leu Lys Pro Phe
245 250 255

Ser Phe Gly Ala Pro Tyr Asn Trp Asn Gln Leu Thr Gln Asp Phe Ser
260 265 270

Arg Pro Glu Asp Thr Phe Asp Tyr Arg Lys Phe Gly Tyr Glu Tyr Asp
275 280 285

Asn Leu Glu Phe Leu Gly Met Ser Val Ala Glu Leu Asp Gln Tyr Ile
290 295 300

Ile Glu His Gln Glu Asn Asp Arg Val Phe Ala Gly Phe Leu Leu Ser
305 310 315 320

Gly Phe Gly Gly Ser Ala Ser Val Asn Phe Gln Val Cys Arg Ala Asp
325 330 335

Ser Thr Cys Gln Asp Ala Gly Tyr Phe Thr Val Leu Gly Gly Ser Ala
340 345 350

Glu Met Ala Trp Ala Phe Asp Arg Leu Tyr Lys Tyr Asp Ile Thr Glu
355 360 365

Thr Leu Glu Lys Met His Leu Arg Tyr Asp Asp Asp Phe Thr Ile Ser
370 375 380

Val Ser Leu Thr Ala Asn Asn Gly Thr Val Leu Ser Ser Ser Leu Ile
385 390 395 400

Pro Thr Pro Ser Val Ile Phe Gln Arg Gly
405 410

<210> 31
<211> 417
<212> PRT
<213> Haliotis tuberculata

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(417)
<223> HtH 2 Domäne f

<400> 31
His Arg Asp Ile Asn Thr Arg Ser Met Ser Pro Asn Arg Val Arg Arg
1 5 10 15

Glu Leu Ser Asp Leu Ser Ala Arg Asp Leu Ser Ser Leu Lys Ser Ala
20 25 30

Leu Arg Asp Leu Gln Glu Asp Asp Gly Pro Asn Gly Tyr Gln Ala Leu
35 40 45

Ala Ala Phe His Gly Leu Pro Ala Gly Cys His Asp Ser Arg Gly Asn

50 55 54 60
Glu Ile Ala Cys Cys Ile His Gly Met Pro Thr Phe Pro Gln Trp His
65 70 75 80
Arg Leu Tyr Thr Leu Gln Leu Glu Met Ala Leu Arg Arg His Gly Ser
85 90 95
Ser Val Ala Ile Pro Tyr Trp Asp Trp Thr Lys Pro Ile Ser Glu Leu
100 105 110
Pro Ser Leu Phe Thr Ser Pro Glu Tyr Tyr Asp Pro Trp His Asp Ala
115 120 125
Val Val Asn Asn Pro Phe Ser Lys Gly Phe Val Lys Phe Ala Asn Thr
130 135 140
Tyr Thr Val Arg Asp Pro Gln Glu Met Leu Phe Gln Leu Cys Glu His
145 150 155 160
Gly Glu Ser Ile Leu Tyr Glu Gln Thr Leu Leu Ala Leu Glu Gln Thr
165 170 175
Asp Tyr Cys Asp Phe Glu Val Gln Phe Glu Val Leu His Asn Val Ile
180 185 190
His Tyr Leu Val Gly Gly Arg Gln Thr Tyr Ala Leu Ser Ser Leu His
195 200 205
Tyr Ala Ser Tyr Asp Pro Phe Phe Phe Ile His His Ser Phe Val Asp
210 215 220
Lys Met Trp Val Val Trp Gln Ala Leu Gln Lys Arg Arg Lys Leu Pro
225 230 235 240
Tyr Lys Arg Ala Asp Cys Ala Val Asn Leu Met Thr Lys Pro Met Arg
245 250 255
Pro Phe Asp Ser Asp Met Asn Gln Asn Pro Phe Thr Lys Met His Ala
260 265 270
Val Pro Asn Thr Leu Tyr Asp Tyr Glu Thr Leu Tyr Tyr Ser Tyr Asp
275 280 285
Asn Leu Glu Ile Gly Gly Arg Asn Leu Asp Gln Leu Gln Ala Glu Ile
290 295 300
Asp Arg Ser Arg Ser His Asp Arg Val Phe Ala Gly Phe Leu Leu Arg
305 310 315 320
Gly Ile Gly Thr Ser Ala Asp Val Arg Phe Trp Ile Cys Arg Asn Glu
325 330 335
Asn Asp Cys His Arg Gly Gly Ile Ile Phe Ile Leu Gly Gly Ala Lys
340 345 350
Glu Met Pro Trp Ser Phe Asp Arg Asn Phe Lys Phe Asp Ile Thr His
355 360 365

22.00.00

55

Val Leu Glu Asn ~~Asn~~ ~~Gly~~ Ile Ser Pro Glu Asp Val ~~Asp~~ Ala Glu
370 375 380

Glu Pro Phe Tyr Ile Lys Val Glu Ile His Ala Val Asn Lys Thr Met
385 390 395 400

Ile Pro Ser Ser Val Ile Pro Ala Pro Thr Ile Ile Tyr Ser Pro Gly
405 410 415

Glu

<210> 32
<211> 403
<212> PRT
<213> *Haliotis tuberculata*

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(403)
<223> HtH 2 Domäne g

<400> 32
Gly Arg Ala Ala Asp Ser Ala His Ser Ala Asn Ile Ala Gly Ser Gly
1 5 10 15

Val Arg Lys Asp Val Thr Thr Leu Thr Val Ser Glu Thr Glu Asn Leu
20 25 30

Arg Gln Ala Leu Gln Gly Val Ile Asp Asp Thr Gly Pro Asn Gly Tyr
35 40 45

Gln Ala Ile Ala Ser Phe His Gly Ser Pro Pro Met Cys Glu Met Asn
50 55 60

Gly Arg Lys Gly Ala Cys Cys Ala His Gly Met Ala Ser Phe Pro His
65 70 75 80

Trp His Arg Leu Tyr Val Lys Gln Met Glu Asp Ala Leu Ala Asp His
85 90 95

Gly Ser His Ile Gly Ile Pro Tyr Trp Asp Trp Thr Thr Ala Phe Thr
100 105 110

Glu Leu Pro Ala Leu Val Thr Asp Ser Glu Asn Asn Pro Phe His Glu
115 120 125

Gly Arg Ile Asp His Leu Gly Val Thr Thr Ser Arg Ser Pro Arg Asp
130 135 140

Met Leu Phe Asn Asp Pro Glu Gln Gly Ser Glu Ser Phe Phe Tyr Arg
145 150 155 160

Gln Val Leu Leu Ala Leu Glu Gln Thr Asp Tyr Cys Gln Phe Glu Val
165 170 175

Gln Phe Glu Leu Thr His Asn Ala Ile His Ser Trp Thr Gly Gly Arg
180 185 190

Ser Pro Tyr Gly Met Ser Thr Leu Glu Phe Thr Ala Tyr Asp Pro Leu
 195 200 205
 Phe Trp Leu His His Ser Asn Thr Asp Arg Ile Trp Ala Val Trp Gln
 210 215 220
 Ala Leu Gln Lys Tyr Arg Gly Leu Pro Tyr Asn Glu Ala His Cys Glu
 225 230 235 240
 Ile Gln Val Leu Lys Gln Pro Leu Arg Pro Phe Asn Asp Asp Ile Asn
 245 250 255
 His Asn Pro Ile Thr Lys Thr Asn Ala Arg Pro Ile Asp Ser Phe Asp
 260 265 270
 Tyr Glu Arg Phe Asn Tyr Gln Tyr Asp Thr Leu Ser Phe His Gly Lys
 275 280 285
 Ser Ile Pro Glu Leu Asn Asp Leu Leu Glu Arg Lys Arg Glu Glu
 290 295 300
 Arg Thr Phe Ala Ala Phe Leu Leu Arg Gly Ile Gly Cys Ser Ala Asp
 305 310 315 320
 Val Val Phe Asp Ile Cys Arg Pro Asn Gly Asp Cys Val Phe Ala Gly
 325 330 335
 Thr Phe Ala Val Leu Gly Gly Glu Leu Glu Met Pro Trp Ser Phe Asp
 340 345 350
 Arg Leu Phe Arg Tyr Asp Ile Thr Arg Val Met Asn Gln Leu His Leu
 355 360 365
 Gln Tyr Asp Ser Asp Phe Ser Phe Arg Val Lys Leu Val Ala Thr Asn
 370 375 380
 Gly Thr Glu Leu Ser Ser Asp Leu Leu Lys Ser Pro Thr Ile Glu His
 385 390 395 400
 lu Leu Gly

<210> 33
 <211> 511
 <212> PRT
 <213> Haliotis tuberculata

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (1)..(511)
 <223> HtH 2 Domäne h

<400> 33
 Ala His Arg Gly Pro Val Glu Glu Thr Glu Val Thr Arg Gln His Thr
 1 5 10 15

Asp Gly Asn Ala His Phe His Arg Lys Glu Val Asp Ser Leu Ser Leu

22.00.00

20

25

30

Asp Glu Ala Asn Asn Leu Lys Asn Ala Leu Tyr Lys Leu Gln Asn Asp
35 40 45

His Ser Leu Thr Gly Tyr Glu Ala Ile Ser Gly Tyr His Gly Tyr Pro
50 55 60

Asn Leu Cys Pro Glu Glu Gly Asp Asp Lys Ile Pro Cys Cys Val His
65 70 75 80

Gly Met Gly Ile Phe Pro Tyr Trp His Arg Leu Leu Thr Ile Gln Leu
85 90 95

Glu Arg Ala Leu Glu His Asn Gly Ala Leu Leu Gly Val Pro Tyr Trp
100 105 110

Asp Trp Asn Lys Asp Leu Ser Ser Leu Pro Ala Phe Phe Ser Asp Ser
115 120 125

Ser Asn Asn Asn Pro Tyr Phe Lys Tyr His Ile Ala Gly Val Gly His
130 135 140

Asp Thr Val Arg Glu Pro Thr Ser Leu Ile Tyr Asn Gln Pro Gln Ile
145 150 155 160

His Gly Tyr Asp Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ala Leu Thr Thr Leu Glu Glu
165 170 175

Asn Asn Tyr Cys Asp Phe Glu Val Gln Tyr Glu Ile Leu His Asn Ala
180 185 190

Val His Ser Trp Leu Gly Gly Ser Gln Lys Tyr Ser Met Ser Thr Leu
195 200 205

Glu Tyr Ser Ala Phe Asp Pro Val Phe Met Ile Leu His Ser Gly Leu
210 215 220

Asp Arg Leu Trp Ile Ile Trp Gln Glu Leu Gln Lys Ile Arg Arg Lys
225 230 235 240

Pro Tyr Asn Phe Ala Lys Cys Ala Tyr His Met Met Glu Glu Pro Leu
245 250 255

Ala Pro Phe Ser Tyr Pro Ser Ile Asn Gln Asp Glu Phe Thr Arg Ala
260 265 270

Asn Ser Lys Pro Ser Thr Val Phe Asp Gln His Lys Phe Gly Tyr His
275 280 285

Tyr Asp Asn Leu Asn Val Arg Gly His Ser Ile Gln Glu Leu Asn Thr
290 295 300

Ile Ile Asn Asp Leu Arg Asn Thr Asp Arg Ile Tyr Ala Gly Phe Val
305 310 315 320

Leu Ser Gly Ile Gly Thr Ser Ala Ser Val Lys Ile Tyr Leu Arg Thr
325 330 335

Asp Asp Asn Asp Glu Glu Val Gly Thr Phe Thr Val Leu Gly Gly Glu
340 345 350

Arg Glu Met Pro Trp Ala Tyr Glu Arg Val Phe Lys Tyr Asp Ile Thr
355 360 365

Glu Val Ala Asp Arg Leu Lys Leu Ser Tyr Gly Asp Thr Phe Asn Phe
370 375 380

Arg Leu Glu Ile Thr Ser Tyr Asp Gly Ser Val Val Asn Lys Ser Leu
385 390 395 400

Pro Asn Pro Phe Ile Ile Tyr Arg Pro Ala Asn His Asp Tyr Asp Val
405 410 415

Leu Val Ile Pro Val Gly Arg Asn Leu His Ile Pro Pro Lys Val Val
420 425 430

Val Lys Lys Gly Thr Arg Ile Glu Phe His Pro Val Asp Asp Ser Val
435 440 445

Thr Arg Pro Val Val Asp Leu Gly Ser Tyr Thr Ala Leu Phe Asn Cys
450 455 460

Val Val Pro Pro Phe Thr Tyr His Gly Phe Glu Leu Asn His Val Tyr
465 470 475 480

Ser Val Lys Pro Gly Asp Tyr Tyr Val Thr Gly Pro Thr Arg Asp Leu
485 490 495

Cys Gln Asn Ala Asp Val Arg Ile His Ile His Val Glu Asp Glu
500 505 510

<210> 34
<211> 210
<212> PRT
<213> Megathura crenulata

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(210)
<223> partielle KLH 1 Domäne c

<400> 34
Ala Ser Leu Arg Tyr Thr Ala Phe Asp Pro Leu Phe Tyr Leu His His
1 5 10 15

Ser Asn Thr Asp Arg Ile Trp Ala Ile Trp Gln Ala Leu Gln Lys Tyr
20 25 30

Arg Gly Lys Pro Tyr Asn Val Ala Asn Cys Ala Val Thr Ser Met Arg
35 40 45

Glu Pro Leu Gln Pro Phe Gly Leu Ser Ala Asn Ile Asn Thr Asp His
50 55 60

Val Thr Lys Glu His Ser Val Pro Phe Asn Val Phe Asp Tyr Lys Thr
65 70 75 80

22.03.00

59

Asn Phe Asn Tyr Glu Tyr Asp Thr Leu Glu Phe Asn Gly Leu Ser Ile
85 90 95

Ser Gln Leu Asn Lys Lys Leu Glu Ala Ile Lys Ser Gln Asp Arg Phe
100 105 110

Phe Ala Gly Phe Leu Leu Ser Gly Phe Lys Lys Ser Ser Leu Val Lys
115 120 125

Phe Asn Ile Cys Thr Asp Ser Ser Asn Cys His Pro Ala Gly Glu Phe
130 135 140

Tyr Leu Leu Gly Asp Glu Asn Glu Met Pro Trp Ala Tyr Asp Arg Val
145 150 155 160

Phe Lys Tyr Asp Ile Thr Glu Lys Leu His Asp Leu Lys Leu His Ala
165 170 175

Glu Asp His Phe Tyr Ile Asp Tyr Glu Val Phe Asp Leu Lys Pro Ala
180 185 190

Ser Leu Gly Lys Asp Leu Phe Lys Gln Pro Ser Val Ile His Glu Pro
195 200 205

Arg Ile
210

<210> 35
<211> 411
<212> PRT
<213> Megathura crenulata

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)...(411)
<223> KLH 1 Domäne d

400> 35
Arg His His Glu Gly Glu Val Tyr Gln Ala Glu Val Thr Ser Ala Asn
1 5 10 15

Arg Ile Arg Lys Asn Ile Glu Asn Leu Ser Leu Gly Glu Leu Glu Ser
20 25 30

Leu Arg Ala Ala Phe Leu Glu Ile Glu Asn Asp Gly Thr Tyr Glu Ser
35 40 45

Ile Ala Lys Phe His Gly Ser Pro Gly Leu Cys Gln Leu Asn Gly Asn
50 55 60

Pro Ile Ser Cys Cys Val His Gly Met Pro Thr Phe Pro His Trp His
65 70 75 80

Arg Leu Tyr Val Val Val Glu Asn Ala Leu Leu Lys Lys Gly Ser
85 90 95

Ser Val Ala Val Pro Tyr Trp Asp Trp Thr Lys Arg Ile Glu His Leu

100 105 110

Pro His Leu Ile Ser Asp Ala Thr Tyr Tyr Asn Ser Arg Gln His His
115 120 125

Tyr Glu Thr Asn Pro Phe His His Gly Lys Ile Thr His Glu Asn Glu
130 135 140

Ile Thr Thr Arg Asp Pro Lys Asp Ser Leu Phe His Ser Asp Tyr Phe
145 150 155 160

Tyr Glu Gln Val Leu Tyr Ala Leu Glu Gln Asp Asn Phe Cys Asp Phe
165 170 175

Glu Ile Gln Leu Glu Ile Leu His Asn Ala Leu His Ser Leu Leu Gly
180 185 190

Gly Lys Gly Lys Tyr Ser Met Ser Asn Leu Asp Tyr Ala Ala Phe Asp
195 200 205

Pro Val Phe Phe Leu His His Ala Thr Thr Asp Arg Ile Trp Ala Ile
210 215 220

Trp Gln Asp Leu Gln Arg Phe Arg Lys Arg Pro Tyr Arg Glu Ala Asn
225 230 235 240

Cys Ala Ile Gln Leu Met His Thr Pro Leu Gln Pro Phe Asp Lys Ser
245 250 255

Asp Asn Asn Asp Glu Ala Thr Lys Thr His Ala Thr Pro His Asp Gly
260 265 270

Phe Glu Tyr Gln Asn Ser Phe Gly Tyr Ala Tyr Asp Asn Leu Glu Leu
275 280 285

Asn His Tyr Ser Ile Pro Gln Leu Asp His Met Leu Gln Glu Arg Lys
290 295 300

Arg His Asp Arg Val Phe Ala Gly Phe Leu Leu His Asn Ile Gly Thr
305 310 315 320

Ser Ala Asp Gly His Val Phe Val Cys Leu Pro Thr Gly Glu His Thr
325 330 335

Lys Asp Cys Ser His Glu Ala Gly Met Phe Ser Ile Leu Gly Gly Gln
340 345 350

Thr Glu Met Ser Phe Val Phe Asp Arg Leu Tyr Lys Leu Asp Ile Thr
355 360 365

Lys Ala Leu Lys Lys Asn Gly Val His Leu Gln Gly Asp Phe Asp Leu
370 375 380

Glu Ile Glu Ile Thr Ala Val Asn Gly Ser His Leu Asp Ser His Val
385 390 395 400

Ile His Ser Pro Thr Ile Leu Phe Glu Ala Gly
405 410

22-03-00

<210> 36
<211> 80
<212> PRT
<213> Megathura crenulata

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(80)
<223> partielle KLH 1 Domäne e

<400> 36
Asp Ser Ala His Thr Asp Asp Gly His Thr Glu Pro Val Met Ile Arg
1 5 10 15
Lys Asp Ile Thr Gln Leu Asp Lys Arg Gln Gln Leu Ser Leu Val Lys
20 25 30
Ala Leu Glu Ser Met Lys Ala Asp His Ser Ser Asp Gly Phe Gln Ala
35 40 45
Ile Ala Ser Phe His Ala Leu Pro Pro Leu Cys Pro Ser Pro Ala Ala
50 55 60
Ser Lys Arg Phe Ala Cys Cys Val His Gly Met Pro Thr Phe Pro Gln
65 70 75 80

<210> 37
<211> 207
<212> PRT
<213> Megathura crenulata

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(207)
<223> KLH2 Domäne b

<400> 37
Leu Arg Tyr Thr Ala Phe Asp Pro Ile Phe Tyr Leu His His Ser Asn
1 5 10 15
Val Asp Arg Leu Trp Ala Ile Trp Gln Ala Leu Gln Ile Arg Arg Gly
20 25 30
Lys Ser Tyr Lys Ala His Cys Ala Ser Ser Gln Glu Arg Glu Pro Leu
35 40 45
Lys Pro Phe Ala Phe Ser Ser Pro Leu Asn Asn Asn Glu Lys Thr Tyr
50 55 60
His Asn Ser Val Pro Thr Asn Val Tyr Asp Tyr Val Gly Val Leu His
65 70 75 80
Tyr Arg Tyr Asp Asp Leu Gln Phe Gly Gly Met Thr Met Ser Glu Leu
85 90 95

22.03.00
62
Glu Glu Tyr Ile His Lys Gln Thr Gln His Asp Arg Thr Phe Ala Gly
100 105 110

Phe Phe Leu Ser Tyr Ile Gly Thr Ser Ala Ser Val Asp Ile Phe Ile
115 120 125

Asn Arg Glu Gly His Asp Lys Tyr Lys Val Gly Ser Phe Val Val Leu
130 135 140

Gly Gly Ser Lys Glu Met Lys Trp Gly Phe Asp Arg Met Tyr Lys Tyr
145 150 155 160

Glu Ile Thr Glu Ala Leu Lys Thr Leu Asn Val Ala Val Asp Asp Gly
165 170 175

Phe Ser Ile Thr Val Glu Ile Thr Asp Val Asp Gly Ser Pro Pro Ser
180 185 190

Ala Asp Leu Ile Pro Pro Pro Ala Ile Ile Phe Glu Arg Gly His
195 200 205

<210> 38
<211> 105
<212> PRT
<213> Megathura crenulata

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(105)
<223> KLH2 Domäne c

<400> 38
Ala Asp Ala Lys Asp Phe Gly His Ser Arg Lys Ile Arg Lys Asp Val
1 5 10 15

Asp Ser Leu Thr Val Glu Glu Gln Thr Ser Leu Arg Arg Ala Met Ala
20 25 30

Asp Leu Gln Asp Asp Lys Thr Ser Gly Gly Phe Gln Gln Ile Ala Ala
35 40 45

Phe His Gly Glu Pro Lys Trp Cys Pro Ser Pro Glu Ala Glu Lys Lys
50 55 60

Phe Ala Cys Cys Val His Gly Met Ala Val Phe Pro His Trp His Arg
65 70 75 80

Leu Leu Thr Val Gln Gly Glu Asn Ala Leu Arg Lys His Gly Phe Thr
85 90 95

Gly Gly Leu Pro Tyr Trp Asp Trp Thr
100 105

Patentansprüche

1. Nukleinsäure-Molekül, umfassend eine für ein Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne oder ein funktionelles Fragment davon mit den immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins kodierende Nukleinsäuresequenz, wobei die Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus

(a) der Gruppe der nachfolgend angegebenen DNA-Sequenzen bzw. der ihnen entsprechenden RNA-Sequenzen:

in SEQ ID NO:1 (HtH1 Domäne b),
SEQ ID NO:2 (HtH1 Domäne c),
SEQ ID NO:3 (HtH1 Domäne d),
SEQ ID NO:4 (HtH1 Domäne e),
SEQ ID NO:5 (HtH1 Domäne f),
SEQ ID NO:6 (HtH1 Domäne g),
SEQ ID NO:7 (HtH1 Domäne h),
SEQ ID NO:8 (partielle HtH2 Domäne b),
SEQ ID NO:9 (HtH2 Domäne c),
SEQ ID NO:10 (HtH2 Domäne d),
SEQ ID NO:11 (HtH2 Domäne e),
SEQ ID NO:12 (HtH2 Domäne f),
SEQ ID NO:13 (HtH2 Domäne g),
SEQ ID NO:14 (HtH2 Domäne h),
SEQ ID NO:15 (partielle KLH1 Domäne c),
SEQ ID NO:16 (KLH1 Domäne d),
SEQ ID NO:17 (partielle KLH1 Domäne e),
SEQ ID NO:18 (KLH2 Domäne b),
SEQ ID NO:19 (KLH2 Domäne c),

(b) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem Gegenstrang einer Nukleinsäuresequenz nach (a) hybridisieren und für ein Polypeptid kodieren, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist;

- (c) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des genetischen Codes zu den unter (a) und (b) definierten DNA-Sequenzen degeneriert sind und für ein Polypeptid kodieren, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist;
- (d) Nukleinsäuresequenzen, die mit einer der unter (a) bis (c) angegebenen Nukleinsäuresequenzen hybridisieren und deren Gegenstrang für ein Polypeptid kodiert, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist;
- (e) Nukleinsäuresequenzen, die wenigstens 60 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen sind;
- (f) Varianten der unter (a) bis (d) angegebenen Sequenzen, wobei die Varianten gegenüber den unter (a) bis (d) angegebenen Sequenzen Additionen, Deletionen, Insertionen oder Inversionen aufweisen und für ein Polypeptid kodieren, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin aufweist; und
- (g) Kombinationen mehrerer der unter (a) bis (f) angegebenen DNA-Sequenzen.

2. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die unter (b) oder (d) angegebene Hybridisierung unter stringenten Bedingungen durchgeführt wird.

3. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das unter (e) angegebene Nukleinsäuremolekül wenigstens 80 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen ist.

4. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das unter (e) angegebene Nukleinsäuremolekül wenigstens 90 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen ist.

5. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das unter (e) angegebene Nukleinsäuremolekül wenigstens 95 % homolog zu einer der unter (a) angegebenen Nukleinsäuresequenzen ist.

6. Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein Desoxyribonukleinsäuremolekül ist.

7. Konstrukt, umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6.

8. Konstrukt gemäß Anspruch 7, weiterhin umfassend einen zur Expressionskontrolle geeigneten Promotor, wobei die für ein Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne oder ein funktionelles Fragment davon kodierende Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle des Promotors steht.

9. Konstrukt gemäß Anspruch 7 oder 8, weiterhin umfassend eine für ein Antigen kodierende Nukleinsäuresequenz, die direkt mit der für ein Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne oder ein funktionelles Fragment davon kodierenden Nukleinsäuresequenz verbunden ist.

10. Konstrukt gemäß Anspruch 9, wobei das Antigen ausgewählt ist aus: Tumorantigenen, Virusantigenen und Antigenen bakterieller oder parasitärer Pathogene.

11. Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 7 bis 10, wobei das Konstrukt wenigstens einen Teil eines Vektors enthält, wobei der Vektor ausgewählt ist aus: Bakteriophagen, Adenoviren, Vacciniaviren, Baculoviren, SV40-Virus und Retroviren.

12. Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 7 bis 11, wobei das Konstrukt weiterhin eine His-Tag-kodierende Nukleinsäuresequenz umfaßt und die Expression des Konstrukt zur Bildung eines Fusionsproteins mit einem His-Tag führt.

13. Wirtszelle, enthaltend ein Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 7 bis 12, wobei die Wirtszelle eine zur Expression des Konstrukts geeignete prokaryontische oder eukaryontische Zelle ist.

14. Wirtszelle gemäß Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß die prokaryontische Wirtszelle ausgewählt ist aus E. coli und Bacillus subtilis.

15. Wirtszelle gemäß Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß die eukaryontische Wirtszelle ausgewählt ist aus Hefezellen, Insektenzellen und Säugerzellen, bevorzugt aus CHO-Zellen, COS-Zellen und HeLa-Zellen.

16. Verfahren zum Herstellen eines Hämocyanin-Polypeptides, wobei das Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 und/oder das Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 7 bis 12 in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert wird und das Protein gegebenenfalls isoliert wird.

17. Verfahren gemäß Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß das hergestellte Hämocyanin-Polypeptid natürlich oder chemisch modifiziert wird.

18. Verfahren gemäß Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Modifikation eine Quervernetzung oder eine kovalente Bindung an ein Antigen ist.

19. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Expression in einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 13 bis 15 durchgeführt wird.

20. Hämocyanin-Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz, die von einem oder mehreren der Nukleinsäuremoleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 6 kodiert wird.

21. Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 20, umfassend wenigstens eine aus der folgenden Gruppe ausgewählte Aminosäuresequenz:

SEQ ID NO:20 (HtH1 Domäne b),

SEQ ID NO:21 (HtH1 Domäne c),
SEQ ID NO:22 (HtH1 Domäne d),
SEQ ID NO:23 (HtH1 Domäne e),
SEQ ID NO:24 (HtH1 Domäne f),
SEQ ID NO:25 (HtH1 Domäne g),
SEQ ID NO:26 (HtH1 Domäne h),
SEQ ID NO:27 (partielle HtH2 Domäne b),
SEQ ID NO:28 (HtH2 Domäne c),
SEQ ID NO:29 (HtH2 Domäne d),
SEQ ID NO:30 (HtH2 Domäne e),
SEQ ID NO:31 (HtH2 Domäne f),
SEQ ID NO:32 (HtH2 Domäne g),
SEQ ID NO:33 (HtH2 Domäne h),
SEQ ID NO:34 (partielle KLH1 Domäne c),
SEQ ID NO:35 (KLH1 Domäne d),
SEQ ID NO:36 (partielle KLH1 Domäne e),
SEQ ID NO:37 (KLH2 Domäne b),
SEQ ID NO:38 (KLH2 Domäne c),

oder ein Fragment einer dieser Sequenzen, das die immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne eines Hämocyanins aufweist.

22. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid, erhältlich durch das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 16 bis 19 oder Modifikationen davon.

23. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 22, **dadurch gekennzeichnet**, daß es die Sequenzen SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23, 24, 25, und 26 umfaßt und Hämocyanin 1 aus *Haliotis tuberculata* ist.

24. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 22, **dadurch gekennzeichnet**, daß es die Sequenzen SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32 und 33 umfaßt und Hämocyanin 2 aus *Haliotis tuberculata* ist.

25. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein scheinbares Molekulargewicht von 370 KDa in SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufweist.

26. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein scheinbares Molekulargewicht von 370 KDa in SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufweist.

27. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Hämocyanin-Polypeptid die Sequenzen SEQ ID NO: 34, 35 und 36 umfaßt und KLH1 aus *Megathura crenulata* ist.

28. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Hämocyanin-Polypeptid die Sequenzen SEQ ID NO: 37 und 38 umfaßt und KLH2 aus *Megathura crenulata* ist.

29. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 20 bis 28, **dadurch gekennzeichnet**, daß es kovalent an Viren, Virenbestandteile, Bakterien, Bakterienbestandteile, DNA, DNA-Bestandteile, anorganische oder organische Moleküle wie z. B. Kohlenhydrate Peptide und/oder Glykoproteine gebunden ist.

30. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 20 bis 29, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Hämocyanin-Polypeptid nicht-glykosyliert ist.

31. Rekombinantes Hämocyanin-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 20 bis 29, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Hämocyanin-Polypeptid glykosyliert ist.

32. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 und/oder ein Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 7 bis 12 und physiologisch verträgliche Zusatzmittel.

33. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 32, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie zur gentherapeutischen Behandlung von Tumoren verwendet wird.

34. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein Hämocyanin-Polypeptid nach einem der Ansprüche 20 bis 31 und physiologisch verträgliche Zusatzmittel.

35. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 34, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie als Antiparasitenmittel, Antivirusmittel oder als Antitumormittel verwendet wird.

36. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 34, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie zum Behandeln einer der folgenden Erkrankungen verwendet wird: Schistosomiasis, Bluthochdruck, Oberflächen-Harnblasenkarzinomen, Epithelkarzinomen, Ovarialkarzinom, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom und Kolonrektalkarzinom.

37. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 34, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie als Impfstoff verwendet wird.

38. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 34, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie zur Kokain-Mißbrauchsvorsorge verwendet wird.

39. Verwendung von Hämocyanin-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 20 bis 31 als Trägerstoff für Arzneimittel.

40. Liposom, umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, ein Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 7 bis 12 und/oder ein Hämocyanin-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 20 bis 31.

41. Liposom gemäß Anspruch 40, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Liposom weiterhin Zellerkennungsmoleküle umfaßt.

42. Antikörper, erhältlich durch Immunisieren eines Versuchstieres mit dem rekombinanten Hämocyanin-Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 20 bis 31.

43. Screening-Verfahren zum Identifizieren von Tumor-spezifischer DNA in einer Zelle umfassend:

- a) das Inkontaktbringen zellulärer DNA und/oder zellulären Proteins mit einer Sonde umfassend die Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 und/oder des Antikörpers gemäß Anspruch 42 und
- b) das Nachweisen der spezifischen Bindung.

44. Screening-Verfahren gemäß Anspruch 43, **dadurch gekennzeichnet**, daß der nachzuweisende Tumor Harnblasenkarzinom, Epithelialkarzinom, Ovarialkarzinom, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom oder Kolonrektalkarzinom ist.

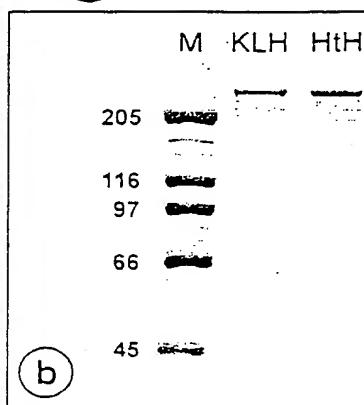
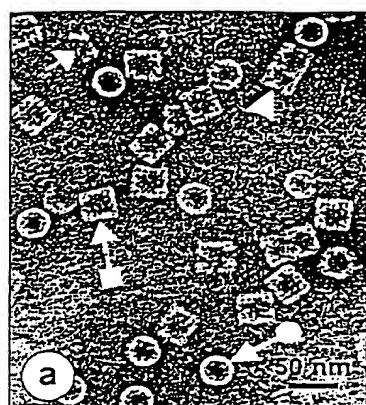
Zusammenfassung

Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für ein Hämocyanin kodierende Nukleinsäuresequenz

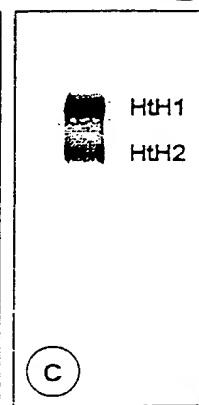
Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine für ein Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne oder ein Fragment mit den immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin kodierende Nukleinsäuresequenz.

Weiterhin betrifft die Erfindung Konstrukte, die das Nukleinsäuremolekül und gegebenenfalls einen zur Expressionskontrolle geeigneten Promotor enthalten. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Konstrukt ferner eine für ein Antigen kodierende Nukleinsäuresequenz. Die Erfindung betrifft außerdem Wirtszellen, die diese Nukleinsäuremoleküle und/oder Konstrukte enthalten. Die Erfindung betrifft ferner die rekombinante Expression der Nukleinsäuremoleküle und/oder Konstrukte in den Wirtszellen. Weiterhin betrifft die Erfindung Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne, ein Fragment mit den immunologischen Eigenschaften wenigstens einer Domäne von Hämocyanin und Hämocyanin-Fusionsproteine, die von den Nukleinsäuremolekülen und/oder Konstrukten kodiert werden. Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Zusammensetzungen, die die Nukleinsäuremoleküle und/oder Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne, ein Fragment davon oder ein Fusionsprotein, enthalten. Weiterhin betrifft die Erfindung Liposomen, die die Nukleinsäuremoleküle und/oder Hämocyanin, eine Hämocyanin-Domäne, ein Fragment davon oder ein Fusionsprotein, enthalten. Ferner betrifft die Erfindung Antikörper, die durch Immunisieren eines Versuchstieres mit dem Hämocyanin, einer Hämocyanin-Domäne, einem Fragment davon oder einem Fusionsprotein, erhältlich sind, und deren Verwendung in Screening-Verfahren zum Identifizieren von Tumoren.

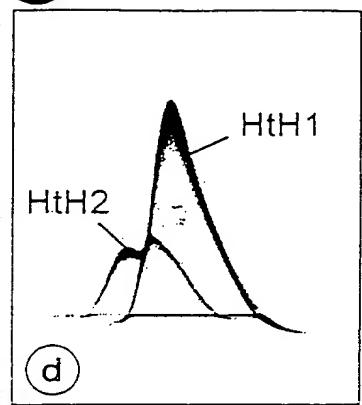
22.03.00



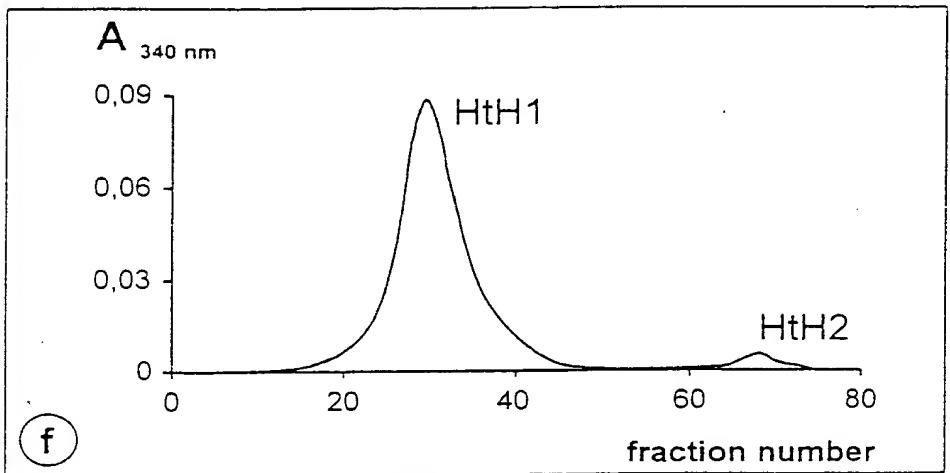
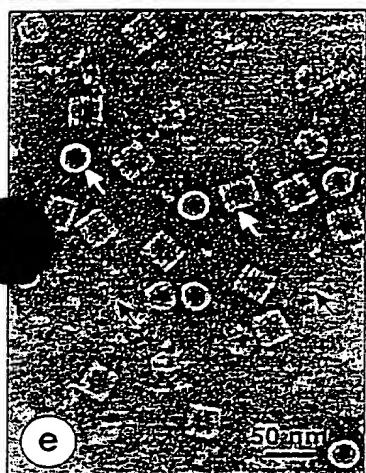
(b)



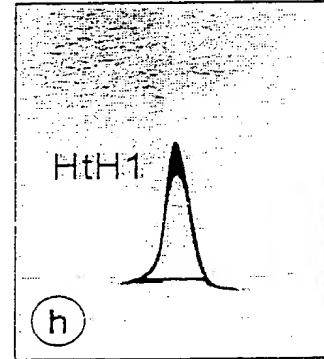
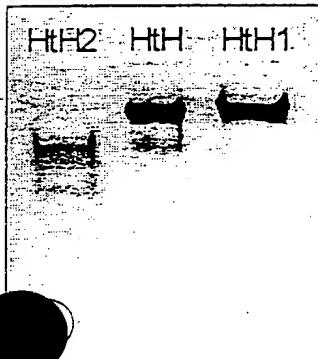
(c)



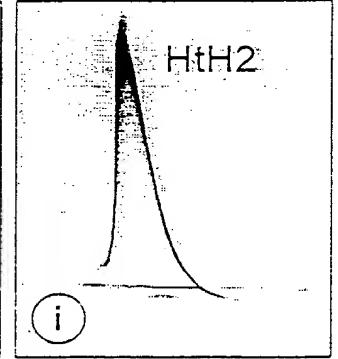
(d)



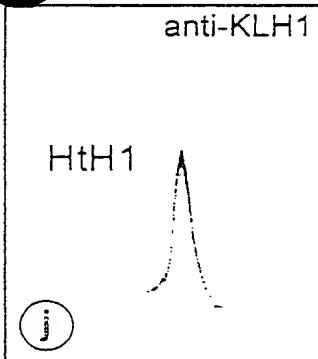
(f)



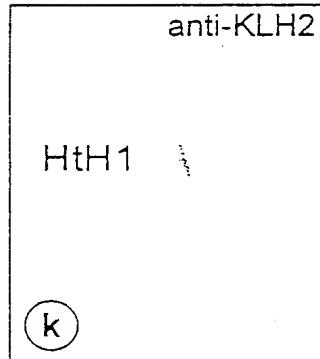
(h)



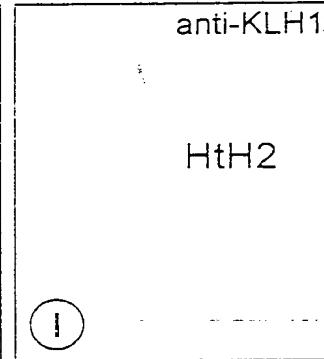
(i)



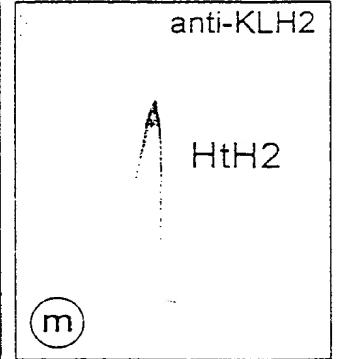
(j)



(k)



(l)



(m)

Fig. 1

22.03.00

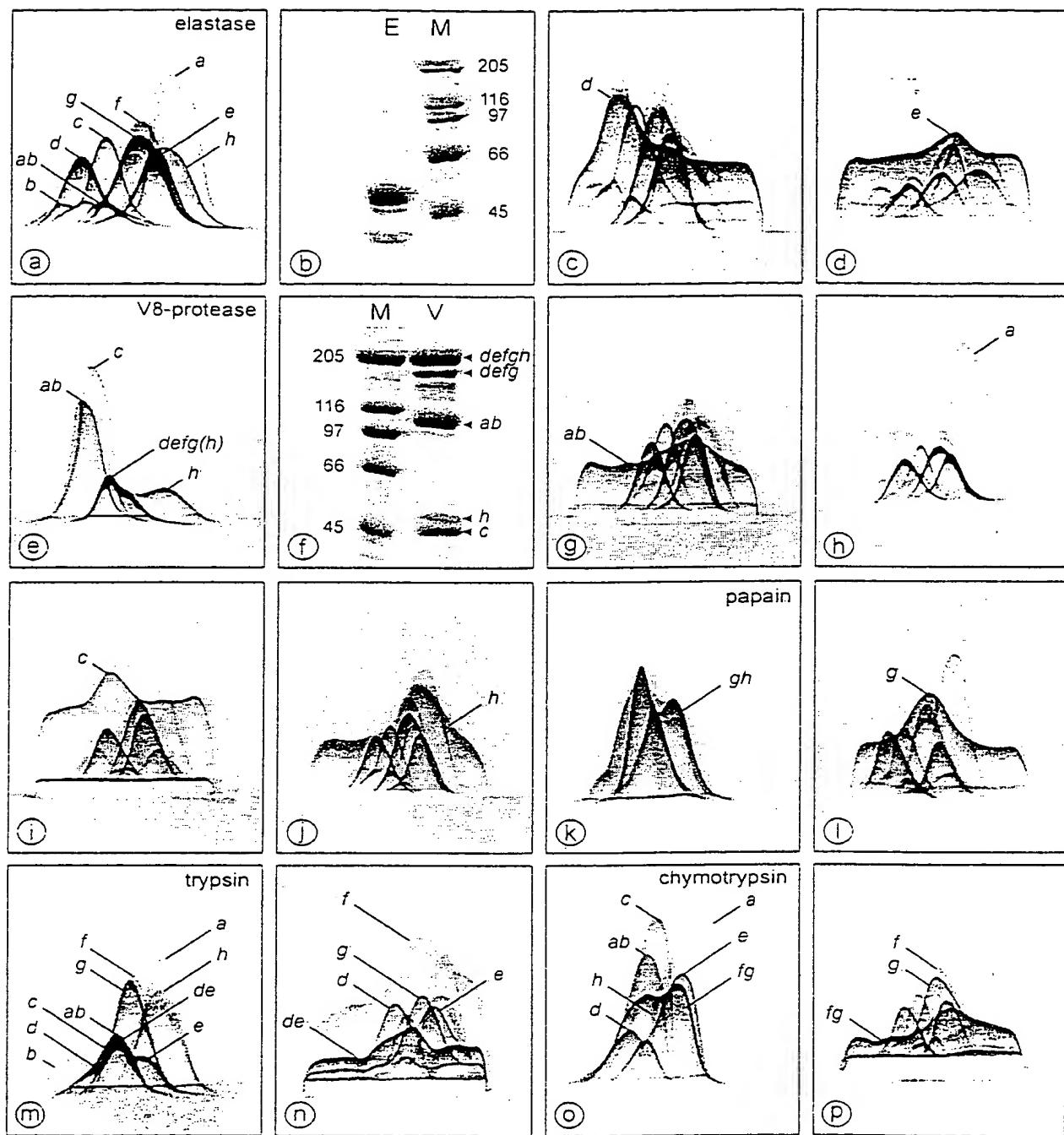


Fig. 2

22.03.86

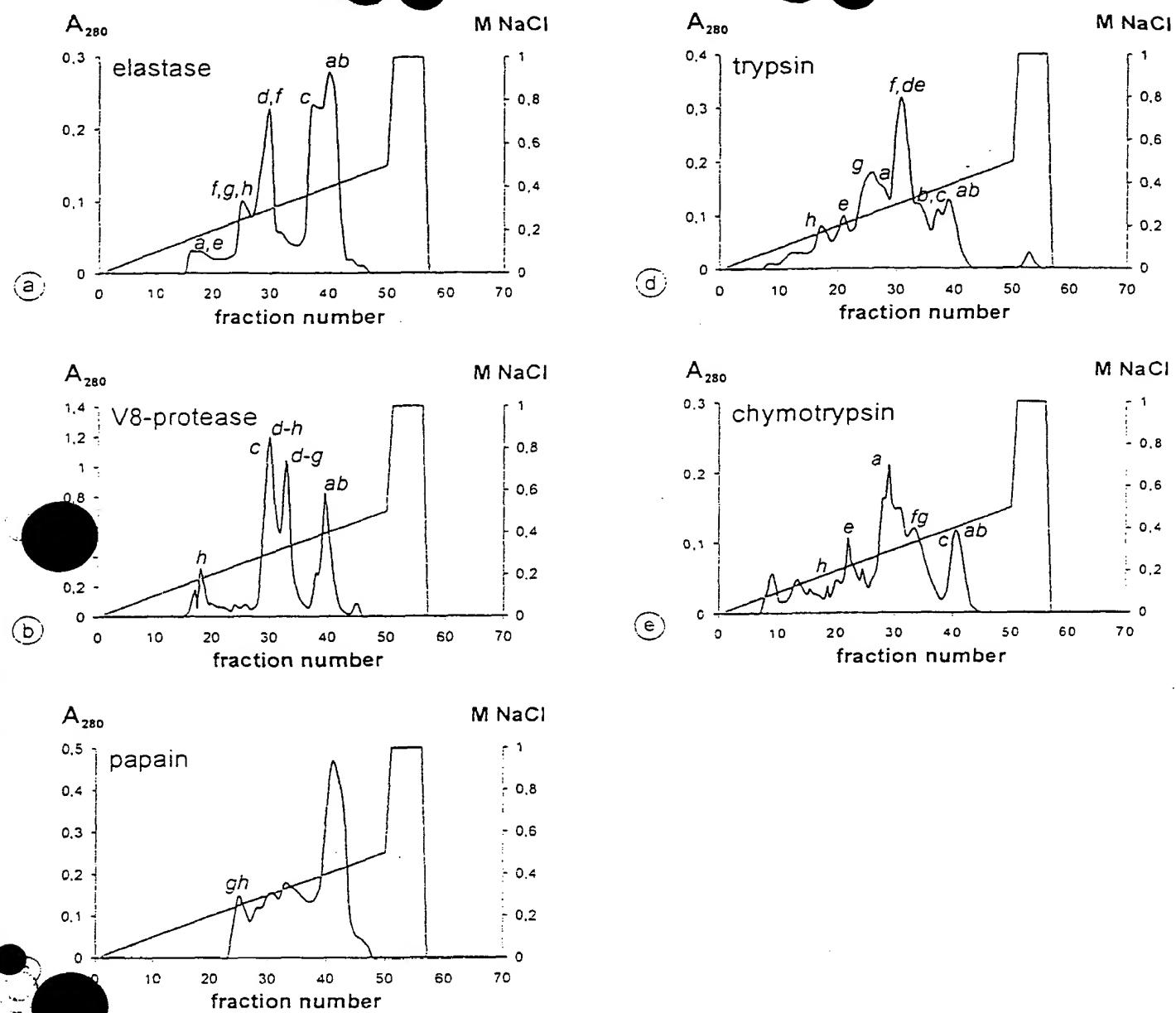


Fig. 3

22.03.00

Figur 4

cDNA-Sequenz in Verbindung mit Intronstruktur des HtH1

Domäne b

AGATCATTGACTCGTGAAGAGGAATACGAGCTAAGGATGGCTCTGGAGAGATTCCAGGCCGACA
CATCCGTTGATGGGTACCAAGGCTACAGTAGAGTACCATGGCCTCCTGCTCGTTGCCACGACCA
GATGCAAAAGTCAGGTTGCCCTGTTATGCATGGCATGGCATCCTCCCTCACTGGCACCGGCT
GTCGTTACCCAGGTGGAAGATGCTCTGTACGGCGTGGATGCCCTATCGGTGTTCCCTATTGGG
ACTGGACAAAACCTATGACTCACCTCCAGACTGGCATCAAATGAGACGTACGTAGACCCGTAT
GGACATACACATCATAATCCATTCTCAATGCAAATATATCTTTGAGGAGGGACACCACAC
GAGCAGGATGATAGATTGAAACTGTTGCCAGTAGCTTTGGGGAGCATTCCATCTGTTG
ATGGAATCCTGTACGCATTGAGCAGGAAGATTCTGCGACTTGAGATTGAGTTAGTC
CATATTCTATTGCGTGGATAGGCCGTTCCGAAGATTACTCCATGCCACCCCTGCATTACAC
AGCCTTGACCCCATTCTACCTTCATCATTCAAATGTCGATCGTCTATGGCAATCTGGCAAG
CTCTTCAAATCAGGAGACACAAGCCATATCAAGCCCAGTGTGACAGTCTGTGGAACAGTTGCCA
ATGAAGCCATTGCTTCCATCACCTCTAACACAACAGAGAACACATAGTCATTGAGTCCC
GACTGACATTGACTACGAGGAAGTGCTGCACTACAGCTACCGATGATCTAACGTTGGTGGGA
TGAACCTTGAAGAAATTGAAAGAAGCTATACATCTCAGACAACAGCATGAACGAGTCTCGCGGGA
TTTCTCCTGCTGGAATAGGAACATCTGCACTTGTGACATTTCATAAATAAACCGGGGACCCA
ACCACTCAAAGCTGGAGATTGCCATTCTGGTGGCCAAGGAAATGCCCTGGCGTTGACC
GCTTGTATAAGGTGAAATAACTGACTCATTAAAGACACTTCCCTGATGTCGATGGAGATTAT
GAAGTCACTTTAAAATTGATGATGACGGAAACGCTCTTGATGACGGACCTGATTCCACACGC
AGCAGTTGTTCTGAGCCAGCTCACCTACCTTGAGGATGAAAAGCACAGCTTACGA

Domäne c

ATCAGAAAAATGTCGACAGCTTGACTCCTGAAGAAACAAATGAACTGCGTAAAGCCCTGGAGCT
TCTTGAAAATGATCATACTGTAGGTGGATTCAATCAGCTTGGCCCTCCATGGAGAGCCTAAAT
GGTGCCTAATCTGAAGCGGAGCACAAGGTTGCCCTGCGTTCATGGCATGGCGTTTCCA
CATTGGCACAGGCTCTGCTCTCCAGGCGGAGAATGCTCTTAGAAAGCATGGTACAGTGGTC
TCTACCATACTGGGATTGGACTGCCCTTCCAACCTCTGATCTGTTAGTCATGAGCAGT
ATACAGATCCTCCGACCATCACGTGAAGCATAACCGTGGTCAATGCCACATCGATACTGA
ATCAGGATACCAACAGCAAGCGTACGGGAGGATCTTATCAACACCTGAATTGACATTTCAC
GGATATTGCTCAACAAGTCCCTTAGCATTAGAACAGATGACTTCTGTTGAGTCAGT
ATGAGATTCCCATAATTTATCCATGCACTTGTAGGAGGAACCGACGCTTATGGCATGGCATCG
CTGAGATATACAGCATACGATCCAATCTTCTGCTCATTCACACCCGACAGGATCTGGC
TATTGGCAATCCCTGCAAAAATACAGAGGAAACCGTACAACACTGCCACTGCCATAGAAT
CTATGAGAAGGCCCTGCAACCATTGGACTAAGCAGTGGCATTAAACCTGACAGAATCACCAGA
GAGCAGTGTATCCGTTGATGTCATTCAACTATAGAGATAACCTCATTACGTATATGATAACCC
GGAATTAAATGGTTGTCGATTCAACAATTGATAGAGAGCTGGAAAAATCAAGAGTCAGAAA
GAGTATTGCTGGATTCTGCTGTCGGGGATTAAAAATCTGCTCTGTGAAATTGAGTTGT
ACTCCACCTGATAATTGTCATAAAGCAGGGGAGTTTATCTACTCGGGGACGAAAACGAGATGGC
TTGGGCCTATGACCGACTTTCAAGTATGATATTACTCAGGTTCTGGAAGCAAACATCTACACT
TCTATGATCATCTCTCATTGCTACGAAGTCTTGATCTTAAAGGAGTGAGTTGGAACTGAC
CTGTTCCACACTGCAAATGTGGTACATGATTCCGGCACAG

22.03.06

Intron c/d

GTACGTGGATTGATTACATAGCAATGCTATATGATTCAGTAATTACAACCTCAAGTCATGTAG
CCGTTTAGATTGCATTACATCAAACAGCATTGGATTAAATTGGGGGATTGTCCAGGCCGCACTTA
TGTGCACTCGAAAATAGTTGTGTCAGTGTCCACGTTAAAATTAAACCATTAAATCATAT
TAGGGATAATTAAATAGATGTTAGTGCTTATTCAATTGTTACAGTGGACAGTCACCAAG
GACATATTACTCTATAGATACACAAACACCAATTAAAACCTGCTTGAAAGTCTAACCTT
TCCCCACAG

Domäne d

GCACCCGTGATCGTGATAACTACGTTGAAGAAGTTACTGGGCCAGTCATATCAGGAAGAATTG
AACGACCTCAATACCGGAGAAATGAAAGCCTAGAGCTGCTTCCTGCATATTCAAGGACGACGG
AACATATGAATCTATTGCCAGTACCATGGCAAACCAAGGCAAATGTCATTGAATGATCATAATA
TTGCGTGTGTGTCATGGTATGCCTACCTTCCCCAGTGGCACAGACTGTATGTGGTTAGGTG
GAGAATGCTCTCCTAAACAGGGATCTGGTGTGGCTGTTACTGGGAGTGGACTGCTCCCAT
AGACCACATCTACCTCATTGATGCAACATACTCAATTCCGACAACAGCGGTACGACC
CTAACCCCTTCTCAGGGAAAGGTTACTTTGAAAACGCAGTCACAACAAGGGACCCACAAGCC
GGGCTTCAACTCAGATTATATGTATGAGAAATGTTACTTGACTGGAGCAGGAAATTATTG
TGACTTTGAAATTCACTGAGCTTGAGCTTGCATAACGCACCTCATTCCATGCTGGAGGTAAAGGGC
AGTACTCCATGTCCTCCCTGGACTATTCTGCGTTGATCCGTCTTCTCCTACATCATGCCAAC
ACGGACAGACTGTGGCAACTGGCAGGAACACTAAAGATTCCGAGAACTGCCTATGAAGAAC
GAACGTGCAATCAACCTCATGCATCAACCACACTGAAGCCGTTAGTGATCCACATGAGAAATCAC
ACAATGTCACTTGAAATACTCAAAACACAGGACGGATTGACTACCAGAACCACTCGGATAC
AAGTATGACAACCTTGAGTTCCATCACTTATCCATCCAAAGTCTTGATGCTACCTGAAGCAAAG
GAGACATCACGACAGAGTGTGCGGGCTTCTTCTCATAACATAGGAACCTCTGCTGACATAA
CTATCTACATATGTCCTGCCTGACGGACGGCGTGGCAATGACTGCAGTCATGAGGCGGGACATT
TATATCCTCGGAGGGCGAAACAGAGATGCTTATCTTGACCGTTGTATAAATTGAAATCAC
CAAACCACTGCAACAGTTAGGAGTCAGCTGCATGGTGGAGTTCGAACTGGAGCTTGAGATCA
AGGCATACAAACGGTTCCTATCTGGATCCCCATACCTTGATCCAACATCATCTTGAAACCTGGA
ACAG

Intron d/e

TAATGCCATCTAATACAGTTGTTGTTAAATTATATGTTGTTACAACACCATACCTTG
ATTGAGGTAAACATCACTGATATTGATAATGTAATGGTAAATTGTTCTGTTGAAACCGT
TTCTGGGGTGTATTCACTATCCACCTGGTGGATAGTGAGTAAACACATTGGTTAATATGGG
TATCTAATGGACAGTGAAAGTGTGCTGGCTAGGCAGATACTGGTTCTGTGAATGGAGGTAGTA
GAAAGGGTTTGATGATTGAG

Domäne e

ATACCCATATCTGGACCACGACCATGAGGAAGAGATACTTGTCAAGGAAGAATATAATTGATTG
AGCCCAAGGGAGAGGGTTCTAGTCAGCTAAAGCTTGCAGAAAGAATGAGAAATGATCGCTCCGCTGA
TGGGTACCAAGCCATTGCCTCTTCCATGCCCTGCCACCACTCTGCCCACATCTGCAGCTC
ACCGTTATGCTGCTGTCCATGGCATGGCTACATTCCCCAGTGGCACAGACTGTACACTGTT
CAGGTTAGGGATGCCCTGAGGAGACATGGTCACTTGTGGTATTCTTACTGGGACTGGACAAA
ACCACTGCAACGAGTTACCCGAGCTTCTTCTTCAGCAACATTATCATCCAATCCGGAATATTA
ATATTCAAAATCCATTCTCGGGCTGACATAGAATTGAGGACCGGGCGTTCATACAGAGAGG
CACATAAAACTGAGCGCCTGTTACAGTGGGATCATGACGGATAACCACAACTGGTTCTCGA
AACTGTTCTTGTGCTTGAAACAGGAAGATTACTGCGATTGAAATACAATTGAGATAGCCC

23.03.00

ATAATGGCATCCACASGGATGGTGGAAAGCGCAGTACATGGGGACACCTCACTATGCA
TCATATGATCCAATTTCACATCCACCATCACAGACGGACAGAATATGGCTATTGGCAAGA
GCTGCAGAAGTACAGGGCTATCTGGTCGAAGCAAACACTGTGCCATTGAACATATGAGAACAC
CCTTGAAGCCTTTAGCTTGGCCACCCACAATTGAATAGTCATACGCAAGAATATTCAAAG
CCTGAGGACACGTTGACTATAAGAAGTTGATACAGATATGATAGTCTGAATTGGAGGGCG
ATCAATTCTGCATTGATGAACTTATCCAGCAGAGACAGGAGAAAGACAGAACTTTGCAGGGT
TCCTCCTAAAGGTTGGTACATCCGCATCTGTGTCATTGCAAGTTGAGGTGATCACACC
TGTAAAGATGCGGCTATTCACTATTCTGGAGGATCAGCCGAAATGCCATGGCGTTCGACAG
GCTTATAAGTATGACATTACTAAACTCTCACGACATGAACCTGAGGCACGAGGACACCTCT
CTATAGATGTAACATCACGTCTTACAATGGAACAGTACTCTGGGAGACCTCATCCAGACGCC
TCCATTATATTGTACCTGGACGCC

Intron e/f

GTGAGTACCTGTTGCACTAAGACTTCTGTAGGCTAAAAGTGTAAAGAAATATCAATTAAATTCAA
TTCACCCAAACTGAAAACGGTACCTATAGGTTAACCTTGTCTACAGTAAACTGAACATAC
CTACACATTCTCATGAAATGATCTCAATATTTCACCAACAG

Domäne f

ATAAAACCAACTCACGGAAACATACACCTAACAGAGTCCGCCATGAGCTAAGTAGCCTTAGTCC
CGTGACATAGCAAGCTTGAAGGCAGCTTGAACAGCCTAACATGATAATGGGACTGATGTTA
TCAAGCTATTGCTGCCTTCATGGCGTTCGCGAGTGCACGAGCCATCTGGACGTGAG

Intron f

GTAAAATTACAGAGCTTATGAAGTGTGTCAGAGTGAAGAGACCAAGATATACTTACCCAAA
ACTAGCTAGCAACAGACGATTCACTGTTGGACACTTGTATTATACGTTGGATECCAAGGT
AAACGGAAACGTAACCGAGAATCAGTCCGTAAGTGAGTGAGTTGGGCTAACGTCGCA
CTCAGCAATACCCAGCTATGTGGCAGCTCTCAGATTACTGCTGGAGGAGAACCTACATAGCCC
GGTTAACCGTGTGGTATGTAGTAAGACCAGCGCGCATGGCTGGTATCTGACGGACGAAGGGT
GGCGCTGCACGTATTCCAGTGGTACAACACTGCACCCCAATTCCACGACCGGAGAACTGATCTC
CCCTTCGGAGATATCGCCTGCCTCCACGGGATTGAACTCGGTGACCTCAAGCCAGCGCGCTT
TAGCGGGGGCGATTAGAGGTTNAAGGCCGACGGCTTACCCACCTTAACATCCCCGGCCCCAC
CCTGACGGAAATGTTATAATTGAGCTTCTTCTTATTAAACACTCTGGCAGATTCTA
TAGATAATGGATTACATGTAGACAGTCTCCATTGTTGAACTGGTAGTCAAGAGTTAGAATCT
GAATACATTCTCCAAGATGGATCAAGGAAAACAATAATTACTGATGTTGAG

ATCGCCTGTTGCATCCACGGCATGGCGACGTTCTCACTGGCACCGGTTGTACACTCTGCAGTT
GGAGCAAGCGCTGCGCAGACACGGGCTCAGTGTGCTGTTCCATACTGGGACTGGACCAAGCCAA
TCACCGAACTGCCACACATTGACAGACGGAGAATATTATGACGTTGGCAAATGCCGCTTG
GCCAATCCGTTGCAAGAGGTTATGTGAAATAAAGATGCATTACGGTGAGAAATGTCCAGGA
AAGTCTGTTCAAAATGTCAAGTGGAAAGCACTCGCTCTGTTGACCAGGCTTGTGGCTC
TTGAACAAACTGACTACTGTGACTTCGAAGTTCAAGTGTGATGCATAACACGATCCATTAT
CTCGTAGGAGGGCGTCAAACGTACGCCCTCTCTCGAGTATTCTCATACGATCCAATCTT
CTTATTCACTCGTTGTTGACAAAATATGGGCTGTATGGCAAGAACTGCAAAGCAGGAGAC
ATCTACAGTTAGAACAGCTGATTGTGCTGGCCTCATGGGTAGGCAATGAGGCCTTCAAC
AAGGATTCAACCACAACTCGTTACCAAGAAGCACCGAGTCCCTAACAGTATTGATTATGA
AGATCTTGGCTATAACTATGACAACCTTGAAATCAGTGGTTAAACTTAAATGAGATCGAGGC
TAATAGAAAACGCAAGTCACATGCTAGAGTCTTGCTGGGTTCTGTTGGATTAGGAAC
TCGGCTGATACATCTGAAATTGCAAGACATCGGAAAATGCCATGATGCTGGTGTATT

22.03.06

CATCCTTGGAGGTTCTGCAGAGATGCATTGGCATAACAACGCCCTACAAGTATGACATTACAG
AAGCATTGCAGGAATTGACATCAACCCCTGAAGATGTTCCATGCTGATGAACCATTTCCTG
AGGCTGTCGGTTGTGCTGTGAATGGAACGTGTCATTCCATCGTCTCATCTTACCCAGCCAACGAT
AATCTATGAACCAGCGAAG

Intron f/g

GTGAGATATATGCAAATTGAATGTTGCCAGATGCGTTTACATTATGCTGGAATTGTC
CTGAACGAATAACAGTGAATAACCAAAAGCTAAAAAATAAAAAGATATACTTCATTCTGAATT
TGTCACTATTGCTGACCCAAAACACGTTATCCATGTCGACACTATATTGCCTTCTGAATCTG
AGACTGCCTATGTTCTAATAATCAGAAATATGGTATACAGGTTGTATCTGTAGAATACCC
AAGGCAGAATTAAAGGGTACACCCCTGTTAACACAG

Domäne g

ATCACCATGACGACCATCAGTCGGGAAGCATAGCAGGATCCGGGTCCGCAAGGACGTGAACACC
TTGACTAAGGCTGAGACCGACAACCTGAGGGAGGCGCTGTGGGGTGTATGGCAGACCACGGTCC
CAATGGCTTCAAGCTATTGCTGCTTCCATGGAAAACCAGCTTGTGTCATGCCATGCCGATGGCC
ACAACACTCATGTTGACTCACGGCATGGCTACCTTCCACACTGGCATCGCCTCTACACCAAG
CAGATGGAGGATGCAATGAGGGCGCATGGCTCATGTCGGCCTGCCACTGGGACTGGACTGC
TGCCTTCACCCACCTGCAACACTGGTCACCGACACGGACAACAACACCCCTTCAACATGGACACA
TTGATTATCTCAATGTCAGCACAACCTCGATCTCCCGAGACATGCTGTTAACGACCCGAGCAT
GGATCAGAGTCGTTCTCTACAGACAAGTCCTTAGCTCTGGAACAAACTGATTCTGCAAATT
CGAAGTTCAGTTGAGATAACCCACAATGCCATCCATTCCGGACAGGTGGCCACAGCCCTACG
GAATGTCCACTCTCGACTTCAGTCCTACGATCCTCTGGCTTACCAACTCCAACACCGAC
AGAATCTGGGCTGTCGGCAAGCTTGCAAGAACATACAGAGGACTCCATACAACCAGTCAATTG
TGAGATCCAGGCAATGAAAACGCCCTGAGGCCTTCAGTGACGATATCAACCACAACCCAGTCA
CAAAGGCTAACGCGAAGCCATTAGATGTTGAGTATAATCGGTTGAGCTTCCAGTACGACAAC
CTCATCTTCCATGGATACAGTATTCCGGAACTTGATCCGCGTGTGAAGAAAGAAAGGAGGAGGA
CAGAATATTGCTGCTTCCCTCTCAGTGGAAATCAAGCGTAGTGCTGATGTTGACATAT
GCCAGCCAGGACACGAATGTTGTTGCGAGGGACTTTGCGATTGGAGGGAGCTAGAAATG
CCCTGGTCCTTGACAGACTGTTCCGCTATGACATACCAAGGTGATGAAGCAGCTACACCTGAG
GCATGACTCGGACTTACGTTAGGGTGAAGATTGTCGGCACTGACGACCAAGGCTTCCCG
ACAGTGTCAAAGCACCAACTATTGAATTGAAACCTGGCG

Intron g/h

Domäne h

TGCACAGAGGCGGGAAAGCACGAAGATGAACACCATGATGACAGACTCGCAGATGTCCTGATAAGG
AAAGAAGTTGACTTCTCTCCCTGCAAGAGGCCAACGCAATTAGGATGCACTGTACAAGCTCCA
GAATGACGACAGTAAAGCGCGTTGAGGCCATAGCTGGCTATCACGGGTATCCTAATATGTGTC
CAGAAAGAGGTACCGACAAGTATCCCTGCTCGTCCACGGAATGCCGTGTTCCCCACTGGCAT
CGCCTGCACACCATTAGATGGAGAGAGCTGAAAACCATGGCTCTCAATGGTATTCTTA
CTGGGATTGGACAAAGAACATGTCGAGTCTTCCATCTTCTTGAGATTCCAGCAACAAACC
CCTTCTACAAATATTACATCCGGGCGTGCAGCACGAAACAACCAGGGACGTTAACAGAGACTC
TTAATCAAACCAAGTTGGTAATTGATTACCTATATTACCTAACTCTGCAAGTCCTGGAGGA
AAACTCATACTGTGACTTGAAGTTCACTATGAGATCCTCCATAACGCCGTCCACTCCTGGCTTG
GAGGAACGGACAGTATTCCATGTCACCCGGAGTATTGAGCCTTCGACCCCTGTTCATGATT
CACCACTCGAGTTGGATAGAATCTGGATCCTTGGCAGAAGTTGCAAAAGATAAGAATGAAGCC

22.03.00

TTACTACGCATTGGA [REDACTED] TGGCGACAGACTTATGAAAGAC [REDACTED] CATCCCTCAACTACG
AAACC GTTAATGAAGATGAATTACCCGCATCAACTCTTCCCAAGCATACTGTTGACCCTAC
AGGTTCAACTATGAATACGATAACATGAGAATCAGGGGT CAGGACATACTGAACCTGAAGAGGT
AATT CAGGAATTAAGAAACAAAGATCGCATATTGCTGGTTTGTCTGGGCTTACGGATAT
CAGCTACAGTGAAAGTATTCAATTCAAGGATACAAGTCACGAAGAATATGCAGGAGAA
TTTGCAGTTGGGAGGTGAGAAGGAGATGCCGTGGCATATGAAAGAATGCTGAAATTGGACAT
CTCCGATGCTGTACACAAGCTTCACGTGAAAGATGAAGACATCCGTTTAGAGTGGTTACTG
CCTACAACGGTGACGTTTACCAACAGGCTGTCTAGCCATTCACTCGTCCACCGTCCAGCCAT
GTGGCTCACGACATCTGGTAATCCCAGTAGGTGCGGGCCATGACCTTCCGCCTAAAGTCGTAGT
AAAGAGCGGCACCAAAGTCGAGTTACACCAATAGATCGTCGGTGAACAAAGCAATGGGGAGC
TGGGCAGCTATACTGCTATGGCTAAATGCATCGTCCCCCTTCTTACCAACGGCTTGAAC TG
GACAAAGTCTACAGCGTCGATCACGGAGACTACTACATTGCTGCAGGTACCCACGCCTGTGTA
GCAGAACCTCAGGCTCCACATCCACGTGGAACACGAGTAG

3'UTR

TTCACAG

Intron 3'UTR

GTGAGGAGAAGGCCCAAGGCTAGCAGGGCAATGGATGAAGGAAATAGGGCAAAGGAAATAGCAG
TTACACCATCGACATTCCAACCTCCTCAGAAACTAATATATAGCCTTAATACAACCAGCCAAGA
CTCAACGGGCAGCCGGGTGGGGATTGGTGTCTGTTAGACCCAGGGTGCAAAATATCA
GTGCGCAAATCAACATGTTGCGTGTAGACACTGACACAGCAGTCATTGAACCTGCAGACCCATA
ACAGGAAAATGGGCAGATA CGATCAAAGACAGTGTAAAATAGGGATAAGTAGGCATATGCAACC
ACCTGATGGAAATGAAAAGGGTAAGTTAAACCCGGTACCAAAGGTCCAATGGTTCTTAAC
CCAGCTTACGCTATCCCTCTAATTCACTGAGTATTGAGCTGATTCTGTCAGTTATGTAAACTGTA
TACTTCTGTATTATTACAG

3'UTR

GTTGCTATGCCGACTGCGCTATATTGGTGAACGAGACGATGAGGACATCTCTGAAAGAGTTGCC
AA GTGATGTGTAGGTACGGAAAGTATTGTTGAGCTAACAAATATGATGATTCAAAATGACTGGC
CTCTAGGACAAAGACATAATTCACTCAGCACCCCTGTGCACCAACTCTTGTTGCTGCAAACGTC
GACAAGCGACACGTCAATCAACAAGCTGTTCAAACACTCAAGTGGATGTAACTAGAATCGTTGGC
CATCGTTCAAAAGTATTGACAGATGTCACACATGATGGCGAGAAACACTTAACTTAACTG
ACCTAGAGTGACTTGTAAATATGTAATATATTCTTCAAAGACTCAGCTGAACATTGTTGGATA
ACACATCAATTCCCTCAACAAAATGCTTATCTCACATGGATGTATGTAATGTGGCCGGCAATA
AAGTATATATATGTATAAAAAAAAAAAAAAA

22.03.06

Figur 5

Abgeleitete Primärstruktur des HtH1

DHLTREEEYELRIMALERFQADTSVDGYQATVEYHGLPARCPRPDAKVRFACCMHGMASFPHWRL
FVTQVEDALVRRGSPIGVPYWDWTKPMTHLPDLASNETYVDPYGHTHHNPFFNANISFEEGHHT
SRMIDSKLFAPVAFGEHSHLFDGILYAFEQEDFCDFEIQFELVHNSIHAWIGGSEDYSMATLHYT
AFDPIFYLLHHSNVDRLWAIWQALQIRRHKPQAHCAQSVEQLPMKPFAPSPPLNNNEKTHSHSVP
TDIYDYEEVLHYSYDDLTFGGMNLEEEIAHRLQQHERVFAGFLLAGIGTSALVDIFINKPGTQ
PLKAGDIAILGGAKEMPWAFDRLYKVEITDSLKTLSDLVDGDYEVTFKIHDHMGNALDSDLIPHA
AVVSEPAHPTFEDEKHSL

RIRKNVDSLTPEETNELRKALELLENDHTVGGFNQLGAFHGEPKWCPNPEAEHKVACCVHGMAVF
PHWHRLALQAENALRKHGYSGLPYWDWTRPLSQLPDLVSHEQYTDPSDHVHKHNPWFNGHIDT
VNQDTTRSVREDLYQQPEFGHFTDIAQQVLLALEQDDFCFSFEVQYEISHNFIHALVGGTDAYGMA
SLRYTAYDPIFFLHSNTDRIWAIWQSLQKYRGKPYNTANCAIESMRRPLQFGLSSAINPDRIT
REHAIPFDVFNYRDLNLHYVYDTLEFNGLSISQLDRELEKIKSHERVFAGFLLSGIKKSALVKEV
CTPPDNCHKAGEFYLLGDENEMAWAYDRLFKYDITQVLEANHLHFYDHLFIRYEVFDLKGVSLGT
DLFHTANVVHDSGT

GTRDRDNYVEEVGTGASHIRKNLNDLNTGEMESELRAAFLHIQDDGTYESIAOYHGKPGKCQLNDHN
IACCVHGMPTFPQWHRLYVVQVENALLNRGSGVAVPYWEWTAPIDHLPHFIDDATYFNSRQQRYD
PNPFFRGKVTFENAVTTRDPQAGLFNSDYMENVLLALEQENYCDFEIQFELVHNALHSMGGKG
QYSMSSLDYSAFDPVFFLHHANTDRLWAIWQELQRFRELPYEEANCAINLMHQPLKPFSDPHENH
DNVTLKYSKPQDGFDYQNHFGYKYDNLEFHHSIPSLSATLQQRHHDRVFAGFLLHNIGTSADI
TIYICLPGRRGNDCSHEAGTFYILGGETEMPFIFDRLYKFEITKPLQQLGVKLHGGVFELEI
KAYNGSYLDPHTFDPTIIFEPGT

DTHILDHDHEEEILVRKNIIDLSPRERVSLVKALQRMKNDRSADGYQAIAFHALPPLCPNPSAA
HRYACCVHGMATFPQWHRLYTVQVQDALRRHGSLSVGIPYWDWTKPVNELPELLSSATFYHPIRNI
NISNPFLGADIEFEGPGVHTERHINTERLFHSGDHDGYHNWFFETVLFALEQEDYCDFEIQFEIA
HNGIHTWIGGSAVHGMGHLHYASYDPIFYIHHSQTDRIWAIWQELQKYRGLSGSEANCAIEHMRT
PLKPFSGPPYNLNSHTQEYSKPEDTFDYKKFGYRYDSLELEGRSISRIDEIQQRQEKDRTFAG
FLLKGFGTSASVSLQVCRVDHTCKDAGYFTILGSAEMPWAFDRLYKYDITKTLHDMNLRHEDTF
SIDVTITSYNGTVLSGDLIQTPSIIFVPGR

AKLNSRKHTPNRVRHELSSLSSRDIASLKAALTSLQHDNGTDGYQAIAAFHGVPACQCHEPSGREI
ACCIHGMATFPWHRLYTLQLEQALRRHGSVAVPYWDWTKPITELPHILTDGEYYDVWQNAVLA
NPFARGYVKIKDAFTVRNVQESLFKMSSFGKHSLLFDQALLALEQTDYCDFEVQFEVMHTIHYL
VGGRTQYAFSSLEYSSYDPIFFIHSFVDKIWAWQELQSRRHLQFRTADCAGLGMQAMRPFNK
DFNHNSFTKKHAVPNTVFDYEDLGNYDNLEISGLNLNEIEALIAKRKSHARVFAGFLLFGLGTS
ADIHLEICKTSENCHDAGVI FILGGSAEMHWAYNRLYKYDITEALQEFIDINPEDVFHADEPFFLR
LSVVAVNGTVIPSSHLLHQPTIIYEPGE

DHHDDHQSGSIAGSGVORKDVNLTKAETDNLREALWGVMDHGPNGFQAIAAFHGKPALCPMPDG
HNYSCCTHGMATFPWHRLYTKQMEDAMRAHGSHVGLPYWDWTAFTLPTLVTDTDNNPFQHGH
IDYLNVSTTRSPRDMLFNDPEHGSESSFYRQVLLALEQTDFCFKFEVQFEITHNAIHSWTGGHSPY
GMSTLDFTAYDPLFWLHHSNTDRIWAWWQALQEYRGLPYNHANCEIQAMKPLRPFSSDDINHNPV
TKANAKPLDVFENRLSFQYDNLIFHGYSIPELDRVLEERKEEDRIFAFAFLSGIKRSADVVFID
CQPGHECVFAGTFAILGGELEMPWSFDRLFRYDITKVMKQLHLRHDSDFTFRVKIVGTDDHELP
DSVKAPTIEFEPG

22-00-00

VHRGGKHEDEHHDRVIRKEVDFLSLQEANAIKDALYKLQDSRGGFIAIGYHGPNC
PERGTDKYPCCVHGMPVFPWHRLHTIQMERALKNHGSPMGIPYWDWTKMSSLPSFFGDSSNNN
PFYKYYIRGVQHETTRDVNQRLFNQTKFGEFDYLYLTLQVLEENSYCDFEVQYEILHNAVHSWL
GGTGQYSMSTLEYSAFDPVFMIHSSLDRIWILWQKLQKIRMKPYYALDCAGDRLMKDPLHPFNY
ETVNEDEFTRINSFPSILFDHYRFNEYEDNMRIRGQDIHELEEVIQELRNKDRIFAGFVLSGLRI
SATVKVFIHSKNDTSHEEYAGEFAVLGGEKEMPWAYERMLKLDISDAVHKLHVVKDEDIRFRVVVT
AYNGDVVTTRLSQPFIVHRPAHADILVIPVGAGHDLPPKVVVKSGTKVEFTPIDSSVNKAMVE
LGSYTAMAKCIVPPFSYHGFELDKVYSVDHGDYYIAAGTHALCEQNLRLHIHVEHE

Figur 6

cDNA-Sequenz in Verbindung mit Intronstruktur des HtH2

Domäne b

GTTTCTTCTGTCACATATTGGTACATCAGCGAATGTTGAAATCATTATAGACCATGGGACTCTT
 CATACTCCGTGGCACGTTGCTGTTCTGGCGAGAGAAGGAGATGAAATGGGATTTGACCG
 TTTGTACAAATATGAGATTACAGATGAACTGAGGCAACTTAATCTCCGTGCTGATGATGTTTCA
 GCATCTCTGTTAAAGTAACTGATGTTGATGGCAGTGAGCTGTCTGAACTCATCCCATCTGCT
 GCTATCATCTCGAACGAAAGCCATATTGACCACAGGACCCGCATCATGACACAATC

Intron b/c

Domäne c

ATTAGGAAAAATGTTGATAATCTTACACCGAGGAAATTAAATTCTCTGAGGGGGCAATGGCAGA
 CCTTCAATCAGACAAAACCGCCGGTGGATTCCAGCAAATTGCTGCTTTCACGGGAACCCAAAT
 GGTGCCAAGTCCCAGTGTGAGAAGAAGTCTCCTGCTGTCCATGGAATGGCTGTCTCCCT
 CACTGGCACAGACTCCTGACCGTGCAAGGCAGAGATGCCCTGAGAAAGCATGGATGTCTGGAGC
 TCTCCCCTACTGGGACTGGACTCGGCCCTGTCTCACCTACCTGATTGGTTGGTAAGTAGCA
 GAACATACACCAGTGCCATATTCCACCGTGGAAAGCCGAAACCCCTGGTACAGCGGCCATATTGAT
 ACAGTTGGTGTGACACAACAAGAACCGTCCGTCAAGAACTGTATGAAGCTCCTGGATTGGCA
 TTAACTGGGTCGCTAACGCAAGTGCTCTGGCTTGGAGCAGGATGACTTCTGTGATTGGAAAG
 TCCAGTTGAGATAGCTACAATTTCATTACCGCTCTTGTGGCGGAAGCGAGCCATATGGTATG
 GCGTCACTCCGTTACACTTATGATCCAATTTCACCTCCATCATTCTAACACTGACAGACT
 CTGGGCTATATGGCAGGCTCTACAAAGTACAGGGGAAACCTTACAATTCCGCCACTGCCA
 TTGCTTCTATGAGAAAACCCCTACAACCCCTTGGTCTGACTGATGAGATCAACCCGGATGAG
 ACAAGACAGCATGCTGTCCTTCAGTGTCTTGATTACAAGAACAACTTCAATTATGAATATGA
 CACCCCTGACTTCAACGGACTATCAATCTCCAGCTGGACCGTGAACTGTACGGAGAAAGTCTC
 ATGACAGAGTATTGCCGGATTTGCTGCATGGTATTCAAGCAGTCTGCACTAGTTAAATTCTT
 GTCTGCAAATCAGATGATGACTGTGACCACTATGCTGGTGAATTCTACATCCTGGTGTGAG
 TGAAATGCCATGGGGCTATGATCGTCTTACAAATATGAGATCACTGAGCAGCTCAATGCCCTGG
 ATCTACACATCGGAGATAGATTCTTCATCAGATAAGCGTTGATCTCATGGTACAAGTCTT
 GAAGCAACATCTTCCCCAACCTCTGTCATACATGACGAAGGGCAG

Intron c/d

GTGAGAACATTGATAATAGTTCAAATGAAGTATATCCGATTCAAGCTGTCGATACAAGATGAGAT
 ACATAATCACAATGTTGTATTAGATATCTCTTTAATTAAATGCCGCTTTATCAATATTGAG
 CAATCCTTCAGCAACATACACCAGCAAATGTTCATCAACAGACTATATTAAATCTTTAAA
 AATCCTTTCTGTTGTTATAAAACTTAAAGTATCGAATTCTGCAATGCGTCTCTGCAGCA
 TATAGTTAAGTTGTTGTTCTGTCAG

Domäne d

GTCACCACAGGCTGACGAGTACGACGAAGTTGTAAGTCTGCAAGCCACATCAGAAAGAATTAA
 AAAGATCTGTCAAAGGGAGAAGTAGAGAGCCTAAGGTCTGCCTTCTGCAACTTCAGAACGACGG
 AGTCTATGAGAATATTGCCAAGTTCCACGGCAAGCCTGGGTTGATGATGATAACGGTCGCAAGG
 TTGCCTGTTGTCATGGAATGCCACCTCCCCAGGGCACAGGCTATGTCCCTCAGGTG

GAGAATGCTTGCTG [REDACTED] AAGGATCTGCCGTCTGTGCCAT [REDACTED] ACTGGACTGAAACATT
TACAGAGCTGCCATCTTGATTGCTGAGGCTACCTATTCATAATTCCGCAACAAACGTTGACC
CTAATCCTTCTTCAGAGGTTAAATCAGTTGAGAATGCTTTACAACACGTGATCCCCAGCCT
GAGCTGTACGTTAACAGGTACTACTACCAAAACGTCATGTTGGTTTGAAACAGGACAACACTG
CGACTTCGAGATAACAGTTGAGATGGTCACAATGTTCTCCATGCTTGGCTTGGAGAGCTA
CTTATTCTATTTCTCTTGATTATTCTGCATTGACCCGTGTTTCCCTTACCATGCGAAC
ACAGATAGATTGTTGGCCATCTGGCAGGAGCTGCAGAGGTACAGGAAGAAGCCATACAATGAAGC
GGATTGTGCCATTAACCTAATGCGCAAACCTCTACATCCCTCGACAACAGTGATCTCAATCATG
ATCCTGTAACCTTAAATACTCAAAACCCACTGATGGCTTGACTACCAGAACAACTTGATAC
AAAGTATGACAACCTTGAGTTCAATCATTCACTATTCCAGGCTGAAAGAAATCATTGTATTAG
ACAACGTCAAGATCGTGTGTTGCAGGATTCTCCTTCACAACATTGGGACATCCGCAACTGTTG
AGATATTGCTGTGTCCTACCACCGCGGTGAGAAAACACTGTGAAACAAAGCCGGAACATT
GCCGTACTCGGAGGAGAAACAGAGATGGCGTTCATTTGACAGACTCTACAGGTTGACATCAG
TGAAACACTGAGGGACCTCGGCATACAGCTGGACAGCCATGACTTGACCTCAGCATCAAGATT
AAGGAGTAAATGGATCCTACCTGATCCACACATCCTGCCAGGCCATCCTGATTTGTGCCT
GGTTCAAGT

Intron d/e

AAGAAAGTTCACTGTCTAAATCTTTTTATGATAGAGGGTAGAGAAGTGGAGAACATGTGACA
ATATATTGAATAAAGTTGTTAAAATTATAACTCTCATAAGTTCATATTATGCTGAAGCTGTAG
CCATCTATAACTGTGTAACATGAAATGTTAACACATTAACCTAAACTTCAGCTGATAACAAAA
CAATGTTAACATACGTCAATGTAACATTTCTATCTTAGGTTATAGCATAAACACTTCAGA
GATACAGTGACGAAAACCTCTATTAAATATTCAAGGT

Domäne e

TCTTCCTGCGCCTGATGGCATTCAAGATGACATCCTGTGAGAAAAGAAGTGAACAGCCTGAC
AACCAAGGGAGACTGCATCTGATCCATGCTCTGAAAAGTATGCAGGAAGACCATTACCTGACG
GGTTCCAAGCCATTGCCTCTTCCATGCTCTGCCACCCTCTGCCCTCACCCTGAGCTCAC
CGTTATGCTGCTGTGTCACGGCATGGCTACATTCCCCAGTGGCACAGATTGTACACTGTACA
GTTCAGGATGCACTGAGGAGACATGGAGCTACGGTAGGTGTACCGTATTGGATGGCTGCGAC
CGCAGTCTCACCTACCAGAGCTTGTACCATGGAGACATACCATGATATTGGAGTAACAGAGAT
TTCCCCAATCCTTCTACCAAGCAATTGAGTTGAAGGGAGAAAACATTACACAGAGAGAGA
GTGATTGCAAGACAAACTTTGTCAGGAGGACACGTTTGATAAAACTGGTTCTCAAACAA
GCCATCCTAGCGCTGAGCAGGAAAACACTGTGACTTTGAGATTGAGATTGAAATTCTCACAAC
GGCGTTCACACGTGGTCGGAGGCAGTCGTACCTACTCTATGGACATCTCATTACGATTCTA
CGACCCTCTTCTACCTTCAACCATTCCAGACAGACCGTATTGGCAATCTGGCAAGAACTCC
AGGAACAGAGAGGGCTCGGGTGTAGAGGCTCACTGTGCTCTGAGCAAATGAGAGAACATTG
AAGCCTTCAGCTCGGCGCTCTTATAACTGGAATCAGCTCACACAGGATTCTCCGACCCGA
GGACACCTTCGACTACAGGAAGTTGGTTATGAATATGACAATTAGAATTCTGGGAATGTCAG
TTGCTGAACGGATCAATACATTATTGAACATCAAGAAAATGATAGAGTATTGCTGGTTCTG
TTGAGTGGATTGGAGGTTCCGCATCAGTTAATTCCAGGTTGAGAGCTGATTCCACATGTCA
GGATGCTGGTACTTCACCGTTCTGGTGGCAGTGAGATGGCGTGGCATTGACAGGCTTT
ACAAATATGACATTACTGAAACTCTGGAGAAAATGCACCTCGATATGATGACTTCACAATC
TCTGTCAGTCTGACCGCCAACACGGAACGTGCTTGAGCAGCAGTCTAATCCAAACACCGAGTGT
CATATTCCAGCGGGACATCGTACATAAATACCAGGAGCATGTCACCG

Intron e/f

22.03.06

Domäne f

AACCGTGGCGCGTGAGCTGAGCGATCTGTCGAGGGACCTGTCTAGTCTCAAGTCTGCTCT
GCGAGACCTACAGGAGGATGATGGCCCCAACGGATACCAGGCTCTGCAGCCTTCATGGGCTAC
CAGCAGGCTGCCATGATAGCGGGAAAATGAGATCGCATGGCATTACAGGATGCCGACCTTC
CCCCAGTGGCACAGACTGTACACCCTGCAGTGGAGATGGCTCTGAGGGACATGGATCATCTGT
CGCCATCCCCTACTGGGACTGGACAAAGCCTATCTCCGAACCTCCCTCGCTTCAACCAGCCCTG
AGTATTATGACCCATGGCATGATGCTGTGGTAAACAACCCATTCTCAAAGGTTTGTCAAATT
GCAAATACCTACACAGTAAGAGACCCACAGGAGATGCTGTTCCAGCTTGAGAACATGGAGAGTC
AATCCTCTATGAGCAAACCTTCTGCTCTGAGCAAACCGACTACTGTGATTTGAGGTACAGT
TTGAGGTCCCTCCATAACGTGATCCACTACCTTGTGGTGGACGTAGACCTACGCATTGCTTCT
CTGCATTATGCCTCCTACGACCCATTCTTCTTATACACCATTCTTGTGGATAAGATGTGGGT
AGTATGGCAAGCTCTCAAAAGAGGAGGAAACTTCCATACAAGCGAGCTGACTGTGCTGTCAACC
TAATGACTAAACCAATGAGGCCATTGACTCCGATATGAATCAGAACCCATTCAAAGATGCAC
GCAGTTCCAACACACTCTATGACTACGAGACACTGTACTACAGCTACGATAATCTGAAATAGG
TGGCAGGAATCTGACCAGCTTCAGGCTGAAATTGACAGAAGCAGAAGCCACGATCGCTTTTG
CTGGATTCTGCTTCGTGGAATCGGAACTCTGCTGATGTCAGGTTTGGATTGTAGAAATGAA
AATGACTGCCACAGGGTGGATAATTTCATCTTAGGTGGAGCCAAGGAAATGCCATGGCATT
TGACAGAAAACCTCAAGTTGATATCACCCATGTAACCGAGAATGCTGGCATTAGCCCAGAGGACG
TGTTTGATGCTGAGGAGCCATTATCAAGGTTGAGATCCATGCTGTTAACAGACCATGATA
CCGTCGTCTGTGATCCAGCCCCAACTATCATCTATTCTCCTGGGAAGGT

Intron f/g

GAGAGAACCACTAATAGCTACTGTCTACAAAGAATGTGTTCATTAAAGACCTGACTGTAGGCCG
ATGGCTGCTGTCATCTCCTCCGCCTCCTCCTGTTCTCCTCCGAAGGGGTGAGCTTCAGGTT
CTCTTCCAATATGCCAACGAGACCTCCTGAGCAGGAGTATATACGTAAGGGAAGCAAGTAT
GGACCATCGCGCGCATGTAGAGATAACATGATCAGCTGTCTGCTGTTCCACTCCTGTCAGACAA
TGAGATAAACATGAATAACAGTATTACTCATCATCGTCCAATTTCACCCCTAGTATTATTAAA
AAATAGGATATTNTATNATNTNTCCCTNTNTATNATTTNNATAGTATATTNTACTTA
NTCTCATCCTAATATTCTGNTATNACANNNTANNATCTNTNTCTNNNNCTCCNCNCTAT
TNNNTCTNNNTACTNTNNNTCTANATTANNA

Domäne g

GCGCTGCTGACAGTGCACACTCGGCCAACATTGCTGGCTCTGGGTGAGGAAGGACGTACGAC
CCTTACTGTGCTGAGACCGAGAACCTAACGACAGGCTCTCAAGGTGTCATCGATGATACCGGT
CCAATGGTTACCAAGCAATAGCATCCTCCACGGAAAGTCTCCAATGTGCGAGATGAAACGGCC
AAGGGTGCCTGTTGCTACGGTATGGCTCTCCACACTGGCACAGACTGTATGTGAAGCA
GATGGAAGATGCCCTGGCTGACCACGGTCACATATCGCATCCCTACTGGACTGGACAACTG
CCTCACAGAGTTACCGCCCTGTACAGACTCCGAGAACAACTCCCTCATGAGGTGCGATT
GATCATCTCGGTGTAACCACGTACGTTCCCCAGAGACATGCTGTTAACGACCCAGAGCAAGG
ATCAGAGTCGTTCTTCTATAGACAAGTCCTCTGGCTTGGAGCAGACTGACTACTGCCAGTTG
AAGTCCAGTTGAGCTGACCCACAACGCCATTCACTCCTGGACAGGTGGACGTAGCCCTACGGA
ATGTCGACCCCTCGAGTTACGCTACGCCAACGCTACGATCCTCTTCTGGCTTACCAACTCC
AATCTGGCTGCTGGCAAGCACTGCAAGAAAATACCGAGGACTCCCATACAACGAAGCACACTGT
AAATCCAGGTTCTGAAACAGCCCTGAGGCCATTCAACGATGACATCAACCACAATCCAATCACC
AAGACTAATGCCAGGCCTATCGATTCTGATTATGAGAGGTTAACTATCAGTATGACACCC
TAGCTTCATGGTAAGAGCATCCCTGAACGTGAATGACCTGCTCGAGGAAAGAAAAGAGAAGAGA
GAACATTGCTGCCCTCCTCTCGTGGAAATCGGTTGCACTGCTGATGTCGTTGACATCTGC
CGGCCCAATGGTGACTGTGCTTGCAGGAACCTTGCTGCTGGAGGGAGCTAGAAATGCC
TTGGTCCTCGACAGACTGTTCCGCTATGACATCACCAGAGTCATGAATCAGCTCCATCTCCAGT

ATGATTCAAGATTCACCTGGGTGAAGCTGTTGCCACCAATGAGCTTCATCAGAC
CTTCTCAAGTCACCAACAATTGAACATGAACATTGG

Intron g/h

GTATGTTATCTTATCATCAAATGTGTGATCAGATACTGGAGACGTTTCATATTAACGGTCAG
CATTAGTTGATGATTTGGTGCATGTTGACGACAAGGAGTCAGCATTAAACACATTCAACACAT
CTTTAATCTGATATGAGAAGGAAATAATTGATCCAGTATTGATGATTGAAGTTAGATTAACAGT
GAAAGATATACCACTGGTATAATCGTATAAAACAGTAGCAGAATTGTATCGTAAAACACTAAATG
TGGGAAGGCGAACGCCAACGAGATTAGATTACGATCGTGTCTAGAATAATTACAATAACCC
AGACGTCGAAATGTGGTTGTCTATGGCAATGGTACGATTAATTGCTAACATGCACGATTAC
TATTCAG

Domäne h

AGCCCACAGAGGACCGAGTTGAAGAACAGAACAGAAGTCACTCGCCAACATACTGACGGCAATGCACACT
TTCATCGTAAGGAAGTTGATTGCTGCTGCCCTGGATGAAGCAAACACTGAAAGAATGCCCTTAC
AAGCTACAGAACGACCACAGTCTAACGGGATACGAAGCAATCTCTGGTACCATGGATAACCCAA
TCTGTGTCGGAAAGAAGGCGATGACAAAATACCCCTGCTGCGTCCCCGGATGGGCATCTTCCTT
ACTGGCACAGACTCTTGACCAATTCAACTGGAAAGAGCTCTTGAGGACAATGGTCACTGCTTGGT
GTTCCCTACTGGGACTGGAAACAAGGACCTGTCGTCAGTGCCTGGGCTTCTCTCCACTCCAGCAA
CAACAATCCCTACTTCAGTACCATCGCCGGTGTGGTACGACACCGTCAGAGAGGCCAACTA
GTCTTATATATAACCAGCCCAAATCCATGGTTATGATTATCTTATTACCTAGCATTGACCACG
CTTGAAGAAAACAATTACTGGGACTTGTGAGGTTCACTGAGATCCACACGCCGTCACACTC
CTGGCTTGGAGGATCCCAGAAGTATTCCATGTCTACCCCTGGAGTATTGGGCTTGTGACCCCTGTCT
TTATGATCCTCACTCGGGCTAGACAGACTTGGATCATCTGGCAAGAACCTCAGAAGATCAGG
AGAAAGCCCTACAACCTCGCTAAATGTGTTATCATATGATGGAAGAGCCACTGGCGCCCTTCAG
CTATCCATCTATCAACCAGGACGAGTTCACCGTGCCAACCTCAAGCCTTACAGTTTGACA
GCCATAAGTCGGCTACCATTACGATAACCTGAATGTTAGGGTCACAGCATCCAAGAACTCAAC
ACAATCATCAATGACTTGAGAAACACAGACAGAACATCTACGAGGATTGTTGTCAAGGATCGG
TACGTCTGCTAGTGTCAAGATCTATCTCGAACAGATGACAATGAGAAGAGTTGGAAACTTCA
CTGTCCTGGAGGAGAGAGGGAAATGCCATGGGCTACGAGCGAGTTCAAGTATGACATCACA
GAGGTTGCAGATAGACTAAAATTAAAGTTATGGGACACCCCTTAACTTCCGGAACTGGAGATCA
CATCCTTACGAATGGAATCGGTGTTAAACAAGAGCCTACCCAAATCCTTACATCTACAGACC
GCCAATCATGACTACGATGTTCTGTTATCCAGTANGGAAGAACCTTCACATCCCTCCCAA
TTGTCGTCAAGAAAGGCACCCGCATCGAGTTCCACCCAGTCGATGATTCACTGAGGACCAAGT
TGTTGATCTGGAAAGCTACACTGCACCTTCAACTGTGTGGTACCACTGGTACATACCAACGGAT
TCGAACCTGAACCAACGTCTATTCTGTCAGCCTGGTACTACTATGTTACTGGACCCACGAGAGAC
CTTGCCAGAATGCAGATGTCAGGATTCAATCCATGTTGAGGATGAGTAA

3'-UTR

CGCAACAGGT

Intron 3'-UTR

GAGATAAGAAACCCTTAACAGTAATCGACACCACATTACAGCTAACATGATTGCCATCGA
TGTGTTCATGTGAGTATACTGCTTTCAAGTTCTACATAATTTGTTTCAAATCAAGTTAGCA
AATGAATCTATCACTGGAAAATAGGGTAGGGTAGCCAAGTGGTAAAGCGGTCACTGATCACGCC
AAAGACGAGTGTCTAACCTGCATGGGTACAAAGTGAAGACCATTGCTGGTCTACGCCGTA

20.03.00

ATATTGTTTTAGTATTGCTAAAACCTATACTCACCATGCGCTGAAAAGTGGAAATAATAATCA
TATTTCACAAAAGCACAAAACCATTCACTTCACTGAAAGCCTCTGTTCACCTGAAAGACGCA
AGAGAACAAATAGTTCTAACATTATTTCAAGACATTGGAAATGTCCTGCACGTGAAACCATATA
TCCTTGAAATTTACGACTGCATCGTATACAATTATGATATAAATTAAAACCTTAT

3'-UTR

TTCTTGGTCTCCACATATTCACATATCAGCACCAATGGTTCGAAGGACATTGGCGTTCTCTC
TGGCAATGCATTCAATACAAACATTGAAAATGACTTCAGCATATCAGTGTGCTTCGAACGTGTT
CGGAAGTACTCAAATGTGCTATGACTGAATTATTGTACATACATAACTATTGATGTTCAATAAA
TAAATGTTGAAACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

22.03.00

Figur 7

Abgeleitete Primärstruktur des HtH2

FFLSHIGTSANVEIIIDHGLHTSVGTFAVLGGEKEMKWGFDRLYKYEITDELQLNLRAADVFS
ISVKVTDVDGSELSELIPSAAIIFERSHIDHQDPHHD

IIRKNVDNLTPPEEINSLRRAMADLQSDKTAGGFQQIAAFHGEPKWCPSPDAEKKFSCCVHGMASF
PHWHRLLTQGENALRKHGCLGALPYWDWTRPLSHLPDLVLVSSRTTPMPYSTVEARNPWYSGHI
DTVGVDTRSVRQELYEAPGFGHYGVAKQVLLALEQDDFCDFEVQFEIAHNFIHALVGGSEPYG
MASLRYTYDPIFYLHHSNTDRLWAIWQALQYRGKPYNSANCAIASMRKPLQFGLTDEINPDD
ETRQHAVPFSVFDYKNNFNYEYDTLDFNGLSISQLDRELSRRKSHDRVFAGFLLHGIIQQSALVKF
FVCKSDDDCDHYAGEFYILGDEAEMPWGYDRLYKYEITEQLNALDLHIGDRFFIRYEAFDLHGT
LGSNIFPKPSVIHDEGAG

HHQADEVYDEVVTAASHIRKNLKDLSKGEVESLRS AFLQLQNDGVYENIAKFHGKPGLCDDNGRKV
ACCVHGMPTFPQWHRLYVLQVENALLERGSAVSVPYWDWTETFTELPSLIAEATYFNSRQQTDFP
NPFFRGKISFENAVTTRDPQPELYVNRYYYQNVMLVFEQDNYCDFEIQFEMVHNVLHAWLGGRAT
YSISSLDDYSAFDPVFFLHHANTDRLWAIWQELQYRKPYNEADCAINLMRKPLHPFDNSDLNHD
PVTFKYSKPTDGFDYQNNFGYKYDNLEFNHFSIPRLEEIIRIRQRQDRVFAGFLLHNIGTSATVE
IFVCVPTTSGEQNCEKAGTFAVLGETEMAHFDRLYRFDISETLRDLGIQLDSHFDLSIKIQ
GVNGSYLDPHILPEPSLIFVPGSSFLRPDG

HSDDILVRKEVNSLTTRETASLIHALKSMQEDHSPDGFQAIASFHALPPLCPSPSAHRYACCVH
GMATFPQWHRLYTVQFQDALRRHGATVGVPYWDWLRPQSHLPELVTMETYHDIWSNRDFPNPFYQ
ANIEFEGENITTEREVIADKLFKVGGHVDNWFQKAILALEQENYCDFEIQFEILHNGVHTWVG
GSRTYSIGHLYAFYDPLFYLHHSQTDRIWAIWQELQEQRGLSGDEAHCALEQMREPLKPFSGA
PYNWNQLTQDFSRPEDTFDYRKFGYEYDNLEFLGMSVAELDQYIIEHQENDRVFAGFLLSGFGGS
ASVNFQVCRADSTCQDAGYFTVLGGS AEMAWAFDRLYKYDITETLEKMLRYDDDFTISVSLTAN
NGTVLSSLIPTPSVIFQRG

HRDINTRSMSPNVRRELSDLSARDLSSLKSALRDLQEDDGPNQYQALAAFHGLPAGCHDSRGNE
IACCIHGMPTFPQWHRLYTLQLEMALRRHGSSVAIPYWDWTKPISELPSSLFTSPEYYDPWHDAVV
NNPFSKGFVFKFANTYTVRDPQEMLFQLCEHGESILYEQTLLALEQTDYCDFEVQFEVLHNVHYL
GGRQTYALSSLHYASYDPFFFIIHSFVDKMWVWQALQKRRKLPYKRADCAVNLMTKPMRPFDS
MNQNPFKMHAVPNTLYDYETLYSYDNLEIGGRNLQAEIDRSRSHDRVFAGFLLRGIGTS
ADVRFWICRNENDCHRGGIIFILGGAKEPWSFDRNFKFDITHVLENAGISPEDVFDAAEPFYIK
VEIHAVNKTMIPIPSSVIAPIIIYSPGE

GRAADSAHSANIAGSGVRKDVTTLVSETENLRQALQGVIDDTGPNQYQAIASFHGSPPMCEMNG
RKGACCAHGMASFPWHRLYVKQMEDALADHGSHIGIPYWDWTTAFTELPALVTDSENNPFHEGR
IDHLCVTTSRSPRDMLFNDPEQGSESFFYRQVLLALEQTDYCDFEVQFEILHNAIHSWTGGRSPY
GMSTLEFTAYDPLFWLHHSNTDRIWAVWQALQYRGLPYNEAHCEIQVLKQPLRPFNDDINHNP
TKTNARPIDSFDYERFNYQYDTLSFHGKSIPELNDLLEERKREERTFAAFLLRGIGCSADVVDI
CRPNGDCVAGTFAVLGGELEMPWSFDRNFKFDITHVLENAGISPEDVFDAAEPFYIK
DLLKSPTEHELG

AHRGPVEETEVTRQHTDGNAHFHRKEVDSLISLDEANNLKNALYKLQNDHSLTGYEASGYHGP
LCPEEGDDKIPCCVHGMGIFPYWHRLLTIQLERALEHNGALLGPYWDWNKDLSSLPAFFSDSSN
NNPYFKYHIAGVGHDTRREPTSLIYNQPQIHGYDLYYLALTTLEENNYCDFEVQYEILHNAVHS
WLGGSQKYSMSTLEYESAFDPVFMILHSGLDRLWIIWQELQKIRRKPYNFAKCAYHMMEEPLAPFS
YPSINQDEFTRANSKPSTVFDQHKFGYHYDNLNRGHSIQELNTIINDLRNTDRIYAGFVLSGIG

22.03.06

TSASVKIYLRTDDNDEEVGTFTVLGEREMPWAYERVKYDITEVADRLKLSYGDTFNFRLEITS
YDGSVVNKS LPNPFI IYRPANHDYDVLVI PVGRNLHIPPKVVKKGTRIEFHPVDDSVTRPVVDL
GSYTALFNCVVPPTYHGFELNHVYSVKPGDYYVTGPTRDLCQNADVRIIHVEDE

22.03.00

Figur 8

cDNA-Sequenz in Verbindung mit Intronstruktur des KLH1

Domäne KLH-1c

TGGCATCGCTTCGCTACACTGCTTTGATCCACTATTCTACTTGCATCACTCTAATACAGATCGT
ATATGGGCAATATGGCAGGCCTTACAGAAGTACAGAGGAAAACCGTACAACGTTGCTAAGTGTG
TGTACATCGATGAGAGAACCTTGCAACCATTGGCCTCTGCCAATATCAACACAGACCATG
TAACCAAGGAGCATTCACTGCCATTCAACGTTTGATTACAAGACCAATTCAATTATGAATAT
GACACTTTGAATTAAACGGTCTCTCAATCTCAGTTGAATAAAAGCTGAAGCGATAAAGAG
CCAAGACAGGTTCTTGCAAGGCTCCTGTTATCTGGTTCAAGAAATCATCTCTGTTAAATTCA
ATATTGCACCGATAGCAGCAACTGTCAACCCGCTGGAGAGTTTACCTCTGGGTGATGAAAAC
GAGATGCCATGGGCATACGATAGAGTCTCAAATATGACATAACCAGAAAAACTCCACGATCTAA
GCTGCATGCAGAAGACCACTCTACATTGACTATGAAGTATTGACCTTAAACCAGCAAGCCTGG
GAAAAGATTGTTCAAGCAGCCTCAGTCATTGACCATGAAAGAATAG

Intron c/d

GTACTTGTATATGTTCGAATATTGCCGATACTTCAATATAACTTATCAAAGTAATTGA
TTAATCTGAAGTAATTTCCTTCCAGTAGAGATTCACTGAGCTGATACAACAAGAATTGCCCTGTT
TATGTCACTTATTTCATCAAACGATTCACTGAGCTGAGCTGTCCATGCCACAATGGGTCTGT
ACTTTCTCGTATGGGTATAGATTATAGACGTGGCAGACCTACGTATAACTAATATTGTG
AATGTCGTTTCAG

Domäne KLH-1d

GTCACCATGAAGGCGAAGTATATCAAGCTGAAGTAACCTCTGCCAACGGTATTCGAAAAAACATT
GAAAATCTGAGCCTGGTGAACCTGAAAGTCTGAGAGCTGCCCTCCTGGAAATTGAAAACGATGG
AACTTACGAATCAATAGCTAAATTCCATGGTAGCCCTGGTTGTGCCAGTTAAATGTAACCCCA
TCTCTTGTGTCCATGGCATGCCACTTCCCTCACTGGCACAGACTGTACGTGGTTGTCGTT
GAGAATGCCCTCTGAAAAAAGGATCATCTGTAGCTGTTCCCTATTGGGACTGGACAAAACGAAT
CGAACATTACCTCACCTGATTCAGACGCCACTTACTACAATTCCAGGCAACATCACTATGAGA
AAACCCATTCCATCATGGCAAATCACACACGAGAATGAAATCACTACTAGGGATCCAAAGGAC
AGCCTCTTCATTGAGACTACTTTACGAGCAGGTCTTACGCCCTGGAGCAGGATAACTCTG
TGATTTGAGATTCACTGAGATATTACACAATGCATTGCTGTTTGATCCTGTGTTCTCCTCATCAGCAACG
AATATTCCATGTCAAACCTTGATTACGCTGTTTGATCCTGTGTTCTCCTCATCAGCAACG
ACTGACAGAATCTGGCAATCTGGCAAGACCTCAGAGGTTCCGAAAACGGCCATACCGAGAAGC
GAATTGCGCTATCCAATTGATGCACAGCCACTCCAGCCGTTGATAAGAGCGACAACAATGACG
AGGCAACGAAAACGCACTCCACATGATGGTTGAATATCAAACAGCTTGGTTATGCT
TACGATAATCTGGAACACTGAATCACTACTCGATTCTCAGCTGATCACATGCTGCAAGAAAGAAA
AAGGCATGACAGAGTATTGCTGGCTCCTCCTTCACAATATTGGAACatCTGCCGATGGCCATG
TATTTGTATGTCTCCAACTGGGAACACACGAAGGACTGCAGTCAGTGGCTGGTATGTTCTCC
ATCTTAGGGGTCAAACGGAGATGTCCTTGATTTGACAGACTTACAAACTTGACATAACTAA
AGCCTGAAAAGAACGGTGTGCACCTGCAAGGGGATTGATCTGGAAATTGAGATTACGGCTG
TGAATGGATCTCATCTAGACAGTCATGCACTCCACTATACTGTTGAGGCCGGAACAG

Intron d/e

GTAAC TATTTGTCACTGTAACCAACAACTGCAGTCTATTTGCAATTACGATAATAACAATTT
TGAAATATATCTTATTAAAGCAAAGGTTCTAGAGACAAACAGCCGGCTAATTATTTTCG
AACTTACGCTTGAGTAAAGATCTGCAAATGGCAACCTACCTATACTATTAAAAATATAATGTTA
CATTCGTATCTGAATGTTAATAAATCACTCATATTCTGTTGCAG

Domäne KLH-1e

ATTCTGCCACACAGATGATGGACACACTGAACCAGTGTGATTGCAAAGATATCACACAATTG
GACAAGCGTCAACAACTGTCAGTGGTGAAGCCCTCGAGTCCATGAAAGCCGACCATTCATCTGA
TGGGTTCCAGGCAATCGCTCCTCCATGCTCTCCTCTTTGTCCATCACCAGCTGCTCAA
AGAGGTTGCGTGCCTGCCATGGCATGCCAACCTCCCGCAATG

32-03-00

Domäne KLH-2c

CTGATGCCAAGACTTGGCCATAGCAGAAAAATCAGGAAAGACGTTGATTCTCTGACAGTCGAA
GAACAAACTCGTTGAGGCGAGCTATGGCAGATCTACAGGACGACAAACATCAGGGGTTCCA
GCAGATTGCAGCATTCCACGGAGAACCAAAATGGTGTCCAAGCCCCGAAGCGGAGAAAAATTG
CATGCTGTGTTCATGGAATGGCTGTTCCCTCACTGGCACAGATTGCTGACAGTTCAAGGAGAA
AATGCTCTGAGGAAACATGGCTTACTGGTGGACTGCCTTACTGGACTGGACA

22.03.06

Figur 11

Abgeleitete Primärstruktur von KLH2

KLH-2b

LRYTAFDPIFYLHHSNVDRlwAIWQALQIRRGKSYKAHCASSQEREPLKPFafssPLNNNEKTYH
NSVPTNVYDYVGVLHYRYDDLQFGGMTMSELEEEYIHKQTQHDRTFAGFFLSYIGTSASVDIFINR
EGHDKYKVGSFVVLGGSKEMKWGFDRMYKYEITEALKTLNVAVDDGFSITVEITDVGSPPSADL
IPPPAIIFERGH

KLH-2c

ADAKDFGHSRKIRKDVSLLTVEEQTSLRRAMADLQDDKTSGGFQQIAAFHGEPKWCPSPEAEKKF
ACCVHGMAVFPWHRLLTQGENALRKHGFTGGLPYWDWT



• 76 •